

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Martin Fraibek

**Studium vlastností virových kapsidových proteinů a vývoj rekombinantních
vakcín a diagnostických komponent založených na umělých virových
strukturách**

**Studies of properties of viral capsid proteins and development of
recombinant vaccines and diagnostic components based on artificial viral
structures**

Dizertační práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 10. 7. 2017

.....

Martin Fraiberk

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů:

- Technologická agentura České Republiky, TAČR, projekt číslo TA03010700
- Specifický vysokoškolský výzkum (SVV), Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt číslo SVV-2017-260426
- BIOCEV – od základního k aplikovanému výzkumu (BIOCEV-FAR), Národní projekt udržitelnosti II (NPUII), Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt číslo LQ1604
- Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci (BIOCEV), Prioritní osa 1– Evropská centra excelence (OP VaVpI), projekt číslo CZ.1.05/ 1.1.00/02.0109

Na tomto místě bych rád poděkoval **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za neocenitelnou pomoc a trpělivost, rady a připomínky, které mi poskytovala během vypracování této dizertační práce a během celého studia a za možnost studovat a pracovat v její laboratoři.

Děkuji Mgr. Karlu Harantovi za analýzu vzorků metodou hmotnostní spektrometrie a RNDr. Haně Španielové, PhD., za pomoc s přípravou a provedením experimentů týkajících se bovinního papilomaviru 1.

Děkuji všem kolegům z laboratoře za veškerou pomoc a za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí, zejména RNDr. Lence Horníkové PhD., za cenné rady a bezmeznou trpělivost a Mgr. Zuzaně Mariničové za psychickou podporu a neocenitelnou pomoc, kterou mi poskytovala v průběhu psaní této práce.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, bratrovi a mé rodině za neutuchající podporu během studia.

Abstrakt

Cílem této studie bylo vytvořit systém pro snadnou produkci různých veterinárních chimérických vakcín založených na stabilních strukturách myšího polyomaviru (MPyV). Systém je určen pro antigeny, které jsou problematické z hlediska produkce nebo stability. Nejprve byly navrženy univerzální vektory pro bakulovirovou produkci chimérických, viru podobných částic (VLPs) nebo pentamer založených na hlavním kapsidovém proteinu VP1 MPyV, k jejich využití jako vakcíny proti jiným patogenům. Různé strategie použité v této studii jsou založené na: A) vystavení vybraných imunogenních epitopů na povrchu VLPs MPyV jejich inzercí do povrchové smyčky proteinu VP1, B) inzerci cizorodých peptidů a proteinů dovnitř VLPs nebo C) fúzi cizorodého proteinu nebo jeho částí s C-koncem proteinu VP1, a tedy vytvoření pentamer chimérického proteinu.

Kandidátní vakcinační antigeny proti prasečímu cirkoviru typu 2 (PCV2), původci systémových chorob spojených s PCV2 (PCV2-SD), který způsobuje významné ekonomické ztráty v chovech prasat, byly připraveny pomocí zkonstruovaných vektorů. Všechny kandidátní vakcíny byly po imunizaci myší schopny indukovat produkci protilátek proti kapsidovému proteinu PCV2. Kandidátní vakcína VarC založená na fúzním kapsidovém proteinu MPyV a PCV2 dokázala indukovat produkci protilátek s nejvyšší neutralizační aktivitou vůči PCV2. Schopnost indukovat produkci neutralizačních protilátek byla ověřena po imunizaci prasat. Výhodou této vakcíny je, kromě její efektivní produkce v hmyzích buňkách a jednoduché purifikace i to, že patří mezi tzv. DIVA vakcíny, pomocí kterých lze rozlišit infikovaná zvířata od zvířat vakcinovaných.

V současné době jsou papilomatózy způsobené bovinními papilomaviry typu 1 nebo 2 (BPV-1 a BPV-2) rozšířené po dobytčích farmách v Evropě, včetně České republiky. V hmyzích buňkách byla proto připravena profylaktická kandidátní vakcína proti BPV-1 založená na VLPs tvořených strukturním proteinem L1 BPV-1 izolátu z českého chovu. Vakcína indukuje specifické protilátky (včetně virus neutralizujících) u myší i skotu.

Obě vakcíny (proti PCV2 a BPV-1) jsou v přípravě pro výrobu firmou Dyntec spol. s r.o.

Klíčová slova: Prasečí cirkovirus, bovinní papilomavirus, myší polyomavirus, VLPs, chimérické nanostruktury, rekombinantní vakcína

Abstract

The aim of this study was to develop a system for easy production of different veterinary chimeric vaccines based on stable mouse polyomavirus (MPyV) structures. The system is designed for antigens that are problematic in production or stability. First, universal vectors for baculovirus-directed production of chimeric MPyV VLPs or pentamers based on the major capsid protein VP1 were designed to be exploited as vaccines against other pathogens. The different strategies used in this study are based on: A) exposure of selected immunogenic epitopes on the surface of MPyV VLPs by inserting them into a surface loop of the VP1 protein, B) insertion of foreign protein molecules inside the VLPs, or C) fusion of a foreign protein or its part with the C-terminus of VP1 protein, thus forming giant pentamers of a chimeric protein.

Candidate vaccine antigens against porcine circovirus 2 (PCV2), the causative agent of porcine circovirus 2 systemic diseases (PCV2-SD) which causes significant economic losses in swine breeding, were prepared using the constructed vectors. All candidate vaccines induced the production of antibodies against the capsid protein of PCV2 after immunization of mice. The candidate vaccine Var C based on fusion of MPyV and PCV2 capsid proteins, is able to induce production of antibodies with the highest PCV2 neutralizing capacity. Its ability to induce production of neutralizing antibodies was verified after immunization of pigs. The advantage of this vaccine, along with its efficient production in insect cells and easy purification, is that it represents a DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) vaccine, as it also induces an immune response against the MPyV VP1 protein and vaccinated and naturally infected animals can thus be distinguished.

Currently, papillomatoses caused by bovine papillomaviruses types 1 or 2 (BPV-1 and BPV-2) are spread throughout cattle farming in Europe including those in the Czech Republic. Therefore, a prophylactic candidate vaccine against BPV-1 based on VLPs formed by structure protein L1 of BPV-1 isolate from a Czech breeding was prepared in insect cells. The vaccine induces specific antibodies (including virus neutralizing ones) in both mice and cattle.

Both vaccines (against PCV2 and BPV-1) are currently being set up for large scale production by Dyntec company.

Key words: Porcine circovirus, bovine papillomavirus, mouse polyomavirus, VLPs, chimeric nanostructures, recombinant vaccine

Obsah:

1.	Úvod	12
2.	Literární přehled.....	15
2.1	Viru podobné částice, obecná charakteristika	16
2.2	Využití VLPs pro vakcinaci	18
2.2.1	Využití VLPs vakcín v humánní medicíně.....	18
2.2.2	Využití VLPs ve vývoji veterinárních vakcín	22
2.2.3	Imunologické vlastnosti VLPs	22
2.3	Polyomaviry.....	23
2.3.1	Obecná charakteristika.....	23
2.3.2	Stavba virionu a organizace genomu myšího polyomaviru.....	25
2.3.3	Vlastnosti strukturních proteinů myšího polyomaviru	27
2.4	Chimérické VLPs polyomavirů a jejich využití (s důrazem na VLPs MPyV).....	30
2.5	Cirkoviry - obecná charakteristika	33
2.5.1	Prasečí cirkovirus 2	34
2.5.2	Patologie PCV2	37
2.5.3	Pokusy o vývoj nových kandidátních vakcín proti PCV2	39
2.6	Bovinní papilomaviry.....	44
2.6.1	Organizace genomu a stavba virionu	44
2.6.2	Bovinní papilomavirus typu 1, BPV1	46
3.	Cíle práce:.....	48
4.	Materiál a metody.....	50
4.1	Bakteriální kmeny.....	51
4.2	Eukaryotické buněčné linie	51
4.3	Viry	51
4.4	Zvířata.....	51
4.5	Plazmidy	52
4.6	Primery	53
4.7	Syntetické oligonukleotidy	53
4.8	Protilátky	54
4.8.1	Primární.....	54
4.8.2	Sekundární.....	54
4.9	Kultivace buněk	54
4.10	Konstrukce univerzálních vektorů pro inzerci sekvencí genů pro cizorodé proteiny, či peptidy.	55

4.10.1	VLP-A	55
4.10.2	VLP-B	56
4.10.3	Kapsomera-C	57
4.11	Konstrukce bakulovirových transferových vektorů BPV-1	58
4.1	Inzerce sekvencí kapsidového proteinu PCV2b do univerzálních transferových vektorů	59
4.2	Příprava rekombinantních bakulovirů.....	60
4.3	Purifikace připravených nanostruktur	61
4.1	Elektronová mikroskopie.....	61
4.1.1	Negativní barvení	61
4.1.2	Imunoelektronová mikroskopie („Flat embedding“)	62
4.1.3	Ultrastrukturní analýza.....	62
4.1.4	Imunoelektronová mikroskopie „High-pressure freezing“ a mrazová substituce	63
4.2	SDS proteinová elektroforéza (SDS-PAGE) a Western blot s následnou imunodetekcí.....	64
4.3	Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE).....	64
4.4	Hmotnostní spektrometrie.....	64
4.1	Stanovení akutní virémie u pokusných prasat metodou RT-PCR.....	64
4.1	Imunizace myší, prasat a skotu	65
4.2	Částečná purifikace a koncentrace viru PCV2	65
4.3	Stanovení protilátek v krevních sérech metodou ELISA.....	65
4.4	Stanovení buněčné imunitní odpovědi in-vitro.....	66
4.5	Nepřímá imunofluorescence.....	66
4.6	Sérum neutralizační test (PCV2).....	66
4.7	Sérum neutralizační test (BPV-1)	67
4.8	Produkce BPV-1 a HPV-16 pseudovirionů	68
4.1	Transfekce buněk WOP	68
4.2	Efekt VP1 MPyV na buněčný cyklus, průtoková cytometrie	68
4.3	Statistická analýza	69
5.	Výsledky.....	70
5.1	Vývoj kandidátních vakcín proti PCV2.....	71
5.1.1	Návrh a konstrukce univerzálních vektorů pro vývoj vakcín.....	71
5.1.2	Výběr izolátu a identifikace imunogenních epitopů proteinu Cap PCV2	72
5.1.3	Příprava a charakterizace nanostruktur odvozených od MPyV nesoucích protein Cap PCV2, nebo jeho imunogenní epitopy.....	72
5.1.4	Charakterizace imunitní odpovědi chimérických nanostruktur v myším modelu	77
5.1.5	Charakterizace imunologických vlastností nanostruktury VarC po imunizaci prasat ...	81
5.2	Stanovení hladiny protilátek proti PCV2 metodou „Blocking“ ELISA.....	85

5.3	Vývoj kandidátních vakcín proti BPV-1	86
5.3.1	Výběr izolátu a identifikace imunogenních epitopů proteinu BPV-1	86
5.3.2	Příprava a charakterizace nanostruktur	87
5.3.3	Imunologická analýza	90
5.4	Publikace týkající se vlastností hlavního kapsidového proteinu VP1 polyomavirů, které jsou součástí této práce a na kterých se autor podílel	94
5.4.1	Hlavní strukturní protein VP1 myšího polyomaviru váže mikrotubuly, zvyšuje jejich acetylaci a zastavuje buněčný cyklus hostitelské buňky.	94
5.4.2	Enkapsidace myšího polyomaviru není závislá na sekvenčně specifickém enkapsidačním signálu.	99
6.	Diskuze	101
6.1	Vývoj veterinárních vakcín a diagnostických komponent	102
6.2	Interakce hlavního kapsidového proteinu VP1 myšího polyomaviru s mikrotubuly	109
6.3	Studium podmínek pro enkapsidaci DNA během morfogenese virionů.....	112
7.	Závěr	115
8.	Další odborné publikace, na kterých se autor podílel	118
8.1	Seroprevalence polyomavirů BKV, JCV a MCPyV v populaci České republiky.	118
8.1.1	Překlad anglického abstraktu článku.....	118
8.1.2	Podíl autora	118
8.2	Antibakteriální, antivirové a na kyslík citlivé nanočástice připravené z elektrosprádaných materiálů.	120
8.2.1	Překlad anglického abstraktu	120
8.3	Role jaderného aktinu a laminů při virové infekci.	122
8.3.1	Překlad anglického abstraktu	122
9.	Seznam použité literatury	123
10.	Přílohy	144
10.1	Seznam příloh:.....	145
10.1.1	Publikace:	145
10.1.2	Patenty, užité vzory, funkční vzorky.....	146
10.1.3	Příloha k publikaci	146

Seznam zkratk:

AHSV	Virus afrického moru koní
AMPV	„Avian metapneumovirus“
APC	Antigen prezentující buňka
BCR	Povrchový imunoglobulin B-lymfocytů
BCR-ABL	Skupina fúzních proteinů vznikajících následkem reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22 (ke zlomům chromozomů dochází v oblasti genů bcr a abl)
BKV	Lidský BK polyomavirus
BN-PAGE	Modrá nativní elektroforéza
BPV	Bovinní papilomavirus
BSA	Bovinní sérový albumin
BSL1	Laboratoř s úrovní zabezpečení „Biosafety level 1“
BTV	Virus katarální horečky ovcí
Cap	Kapsidový protein cirkovirů
CaV	Kanárčí cirkovirus
CD	„Cluster of differentiation“, molekuly exprimované určitou skupinou buněk
CD4+	Buňky exprimující CD4
CD69+	Buňky exprimující CD69
CD8+	Buňky exprimující CD8
CD86+	Buňky exprimující CD86
CTL	Cytotoxické T-lymfocyty
DAPI	4',6-diamidin-2-fenyindol
DC	Dendritická buňka
DIVA	Vakcína, pomocí které lze odlišit vakcinovaná zvířata od infikovaných zvířat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dpt	Den po transfekci
E1 – E8	Virový časný protein 1-8
EGFP	Zelený fluorescenční protein
FACS	Průtokový cytometr
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA
GoCV	Husí cirkovirus

GP5	Obalový protein GP5 viru PRRSV
HaPyV	Křeččí polyomavirus
HBV	Virus hepatitidy B
Her2/neu	Protoonkogen, jehož zvýšená exprese je spojena s některými nádory
HEV	Virus hepatitidy E
HIV	Virus lidské imunodeficiency
HLA-A	CTL epitop chřipky typu A
HPV	Lidský papilomavirus
Hsp70	Protein teplotního šoku 70
Hsp90	Protein teplotního šoku 90
IBDV	Virus infekční burzitidy drůbeže
IFN- γ	Interferon gamma
IL-12	Interleukin 12
IL-15	Interleukin 15
IL-18	Interleukin 18
IL-2	Interleukin 2
ISRE	Interferonem stimulovaný element
JCV	Lidský polyomavirus JC
kDa	kiloDalton
KHL	"Keyhole limpet hemocyanin"
L1	Hlavní kapsidový protein papilomavirů
L2	Vedlejší kapsidový protein papilomavirů
LB	Luria-Bertani médium
LCR	Regulační oblast genomu papilomavirů
LT	Velký tumorogenní antigen
MCS	"Multiple cloning site"
MHCI	MHC glykoproteiny I. Třídy
MHCII	MHC glykoproteiny II. Třídy
MOI	Multiplicita infekce
MPyV	Myší polyomavirus
MT	Střední tumorogenní antigen polyomavirů
NA	Test přítomnosti neutralizačních protilátek („neutralization assay“ – NA)
NGS	Normální kozí sérum

NLS	Jaderný lokalizační signál
ORF	Otevřený čtecí rámec
ORI	Počátek replikace
p239	Část domény E strukturního proteinu nukleokapsidy viru hepatitidy E
p53	Tumor protein 53, onkosupresor
p7	Protein virového core viru hepatitidy C
PBFD	Virus onemocnění zobáku a peří papoušků
PBS	Fosfátový pufr
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCV	Prasečí cirkovirus
PCV2-SD	Onemocnění asociovaná s PCV2
PDNS	„Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome“
PFU	Plak formující jednotka
PiCV	Holubí cirkovirus
PMWS	Syndrom chřadnutí selat po odstavu
PPV	Prasečí parvovirus
PRRSV	Prasečí respirační virus
PRV	Prasečí herpes virus
PTA	Kyselina fosfowolframová
Rep	Nestrukturní protein cirkoviru
RT	Laboratorní teplota
RT-PCR	PCR v reálném čase
S1	Povrchový antigen HBV
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsulfát sodný
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
SEM	Střední chyba průměru
SES	Enkapsidační sekvence viru SV40
SIV	Virus prasečí chřipky
Sp1	Transkripční faktor Sp1
SPV	Prasečí poxvirus
ST	Malý tumorogenní antigen polyomavirů
SUMO	„Small Ubiquitin-like Modifier“

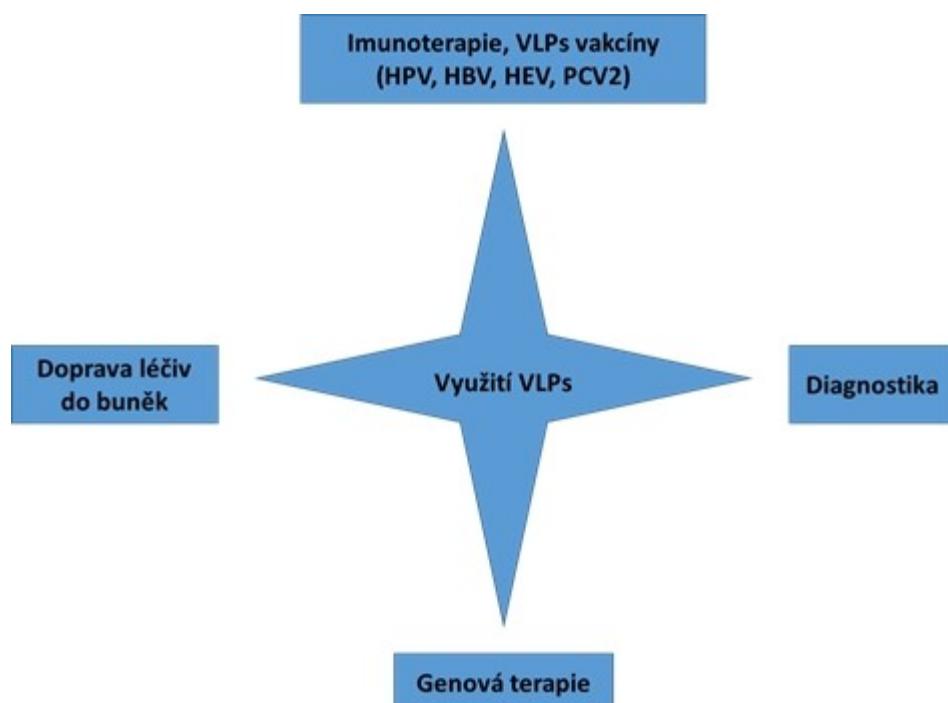
SV40	Opičí polyomavirus
TRP2	Tyrozináza 2
TT	"Tinny" tumorogenní antigen polyomavirů
TTV	Transfusion-transmitted virus
tVP3	Zkrácená forma minoritního kapsidového proteinu myšího polyomaviru (C-koncové aminokyseliny 105–204)
VarA	VLP MPyV nesoucí na svém povrchu imunogenní epitopy PCV2
VarB	VLP MPyV nesoucí uvnitř Cap PCV2
VarC	Chimérická pentamerní nanostruktura složená z fúzního proteinu VP1-Cap-His
VLPs	Viru podobné částice
VP1	Virus katarální horečky ovčí
VP2	Minoritní kapsidový protein polyomavirů
VP3	Minoritní kapsidový protein polyomavirů
WHO	Světová zdravotnická organizace
YY1	Transkripční faktor YY1
pRb	„Retinoblastoma protein“, onkosupresor

1. Úvod

Proteiny virových pouzder jsou selektovány evolucí pro účinný vstup virů přes cytoplasmatickou membránu do buněk a pro dopravu virové genetické informace a jiných molekul nacházejících se uvnitř či na povrchu virové částice do buněčného jádra či jiných buněčných kompartmentů pro genovou expresi. Viry tak reprezentují přírodní, vysoce specializované transferové systémy, které mají potenciál využití v přenosu nukleových kyselin, proteinů nebo jejich částí a také nízkomolekulárních látek do buněk.

Studium struktur, vlastností a interakcí virových kapsidových nebo obalových proteinů a pochopení molekulárních mechanismů časné fáze virové infekce - vstup viru do buňky, jeho pohyb buňkou, rozvolnění virových struktur, ale také mechanismů morfogeneze virionů v pozdní fázi infekce jsou nutným předpokladem pro racionální vývoj transportních prostředků založených na virových strukturách pro přenos léčivých nebo jiných látek do buněk pro terapeutické či diagnostické účely.

Kapsidové proteiny mnoha virů mají schopnost uspořádat se spontánně do struktur prázdných kapsid (VLPs, „virus like particles“). Výzkum využití VLPs, nebo struktur od nich odvozených, je zaměřen na různé oblasti, jako je jejich využití v přípravě vakcín, pro dopravu DNA v genové terapii a pro dopravu různých dalších terapeutických látek (RNA, nízkomolekulárních léčiv či diagnostických komponent) do buněk (obr. 1).



Obrázek 1: Hlavní aplikace pro využití VLPs.

Laboratoř virologie katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK se dlouhodobě zabývá molekulárními mechanismy infekce malými neobalenými DNA viry čeledi

Polyomaviridae a také využitím jejich kapsidových proteinů k terapeutickým a diagnostickým účelům. Hlavním úkolem této práce bylo vyvinout vakcíny pro veterinární účely. Proto bude těžiště následujícího literárního úvodu spočívat v přehledu využití VLPs jako vakcín proti virům, od kterých jsou odvozeny, nebo chimérických VLPs či jiných kapsidových struktur nesoucích imunologicky významné části jiných virů.

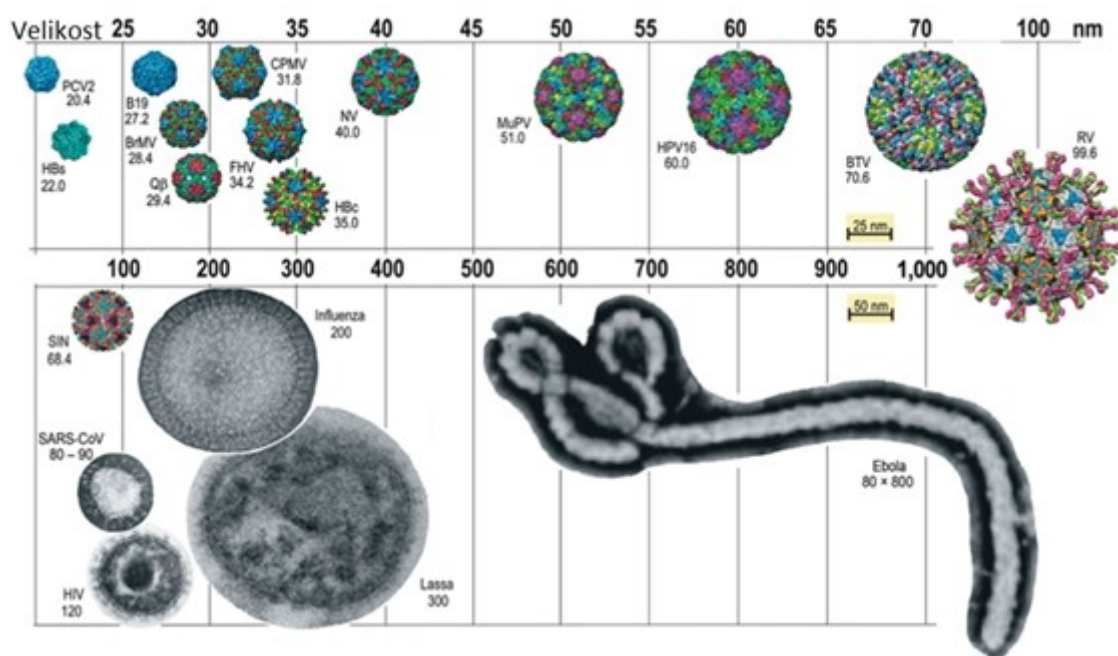
2. Literární přehled

2.1 Viru podobné částice, obecná charakteristika

Viru podobné částice (VLPs) jsou multimerní struktury složené z jednoho nebo více strukturních proteinů viru a vykazují velmi podobné prostorové a konformační uspořádání jako původní viry, od kterých jsou odvozené. Mezi jejich nejvýhodnější vlastnosti patří:

- dobře definovaná geometrie s repetitivním charakterem povrchových struktur
- schopnost zachovat nativní konformaci antigenů
- použitelnost pro vkládání cizích strukturních prvků (chimérické VLPs)
- schopnost překonat bariéru cytoplasmatické membrány

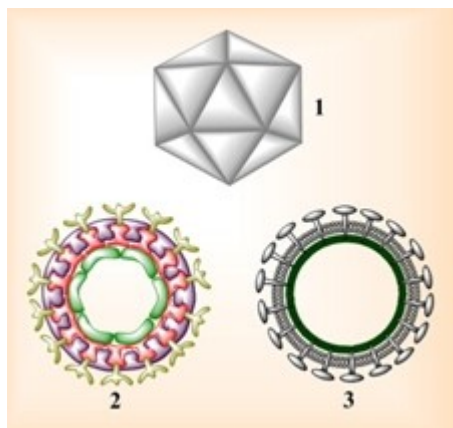
V současné době jsou popsány VLPs odvozené od širokého spektra obalených i neobalených virů (obr. 2).



Obrázek 2: Příklady VLPs od významných zástupců neobalených a obalených virů v poměrném měřítku.

Neobalené VLPs jsou prezentovány jako trojrozměrné modely vygenerované na základě krystalografických struktur. VLPs odvozené od obalených virů jsou vyobrazeny jako elektronmikroskopické fotografie. Převzato a upraveno z Pushko et al., 2013.

Na základě jejich morfologie můžeme rozlišit tři základní typy VLPs – jednovrstevné neobalené, vícevrstevné neobalené a obalené, (obr. 3).



Obrázek 3: Schématické zobrazení základních morfologických typů VLPs.

1 – jednovrstevné, neobalené, **2** – vícevrstevné, neobalené, **3** – obalené VLP. Převzato z F. Liu et al., 2013.

Jednovrstevné neobalené VLPs jsou strukturně jednoduché, tvořené zpravidla jedním nebo dvěma kapsidovými proteiny. Příkladem těchto VLPs mohou být částice odvozené od parvovirů (Martínez et al., 1992), picornavirů (Mohana Subramanian et al., 2012), polyomavirů (Salunke et al., 1986) a papilomavirů (Sapp et al., 1995).

Neobalené VLPs mohou být také složené z více vrstev, kde každá má ikosahedrální symetrii. Příkladem může být úspěšná produkce částic odvozených od reovirů, jako je virus afrického moru koní („African horsesickness virus“, AHSV) složených ze dvou strukturních proteinů VP3 a VP7 (Maree et al., 1998), či VLPs viru katarální horečky ovčí („Bluetongue virus“, BTV), které jsou složeny z celkem čtyř strukturních proteinů (VP2, VP3, VP5 a VP7). Produkce VLPs BTV v bakulovirovém expresním systému byla dosažena vytvořením nového typu bakulovirového vektoru umožňujícího inzerci čtyř cizích genů do bakulovirového genomu (Belyaev a Roy, 1993). Dalším příkladem mohou být VLPs odvozené od rotavirů (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Conner et al., 1996). Obecně je konstrukce a produkce těchto vícevrstevných neobalených typů mnohem náročnější než jednovrstevných VLPs, neboť zahrnuje kooexpresi několika strukturních proteinů, pokud možno ve správných stechiometrických poměrech. Také účinnost skládání těchto částic je zpravidla nízká (Palomares a Ramírez, 2009).

Kromě neobalených virů jsou k produkci VLPs hojně používány i obalené viry. VLP tohoto typu se skládá z lipoproteinové membrány, která obklopuje virovou nukleokapsidu. Lipidová membrána pochází z hostitelské buňky a obsahuje inkorporované virové proteiny odpovědné za rozpoznání receptoru, nebo i proteiny s jinou funkcí. Proces formování těchto částic můžeme rozdělit celkem do třech fází: i) formování nukleokapsidy, ii) obalování

lipidovou membránou a iii) proces pučení částice. Příprava a preparace těchto komplexních částic je extrémně náročná. Pro úspěšné zformování obalené částice musí dojít ke správné interakci mezi proteiny nukleokapsidy, proteiny nukleokapsidy a obalovými proteiny a mezi obalovými proteiny a lipidovou membránou. Dalším problémem je pak samotný proces purifikace částic, kdy často dochází ke koprecipitaci různých buněčných lipidů, nukleových kyselin a proteinů. I přes tyto problémy byly připraveny obalené VLPs významných virů, jako je virus lidské imunodeficiency („Human immunodeficiency virus“, HIV) (McBurney et al., 2007), viru chřipky (Bright et al., 2007; Perrone et al., 2009; Pushko et al., 2007), viru Ebola (Warfield et al., 2003), či Lassa viru (Branco et al., 2010).

2.2 Využití VLPs pro vakcinaci

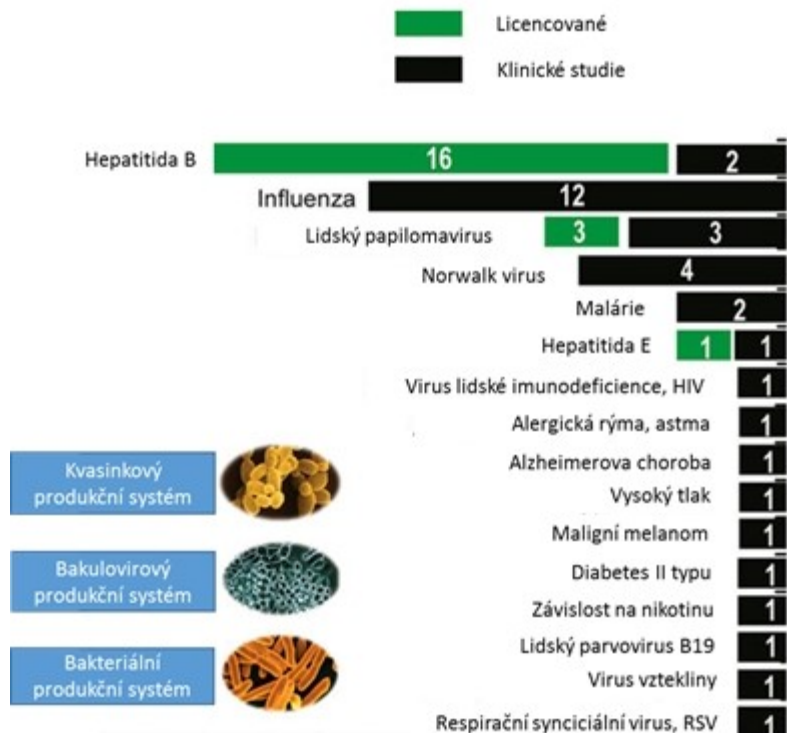
Klasické vakcíny reprezentované inaktivovanými viry, nebo živými atenuovanými viry, stále představují nezanedbatelné riziko buď nedostatečné inaktivace, nebo reverze použitého antigenu zpět na virulentní formu. S rozvojem metod genového inženýrství se do popředí zájmu dostaly vakcíny založené na produkci rekombinantních proteinů v heterologních expresních systémech, které tyto nedostatky odstraňují. Nevýhodou proti klasickým vakcínám je poměrně nižší účinnost a nutnost použití adjuvans. Tyto nevýhody řeší vakcíny založené na VLPs.

Mezi nejvýhodnější vlastnosti VLPs vakcín patří:

- vyšší stabilita a antigenicita než u antigenů obsažených v subjednotkových vakcínách
- bezpečnost daná absencí genomů původních virů, a tedy neschopností se replikovat v organismu
- v případě veterinárního využití schopnost splnit požadavky na odlišení vakcinovaných a infikovaných zvířat, DIVA vakcíny (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

2.2.1 Využití VLPs vakcín v humánní medicíně

Nejrozšířenějším využitím VLPs je jejich použití ve vakcinologii, kde se do povědomí dostaly díky již třem registrovaným vakcínám proti lidským papilomavirům (HPV), hepatitidě B (HBV) a hepatitidě E (HEV). Další lidské vakcíny založené na VLPs technologii jsou ve stádiu výzkumu, či dokonce klinických zkoušek (obr. 4).



Obrázek 4: Přehled a počet licencovaných vakcín a vakcín v klinických studiích od roku 1986 do roku 2015.

Produkcce probíhá v bakteriálním, kvasinkovém a bakulovirovém expresním systému. Převzato a upraveno z Huang et al., 2017.

Snad nejznámější lidskou vakcínou založenou na VLPs je vakcína proti HPV, která je velmi účinná při prevenci rakoviny děložního čípku, čtvrté nejrozšířenější rakoviny žen starších 40 let s mortalitou dosahující odhadem 50 % (WHO 2014). HPV je původcem i dalších novotvarů jako jsou rakovina hlavy a krku, benigní genitální bradavice u žen a mužů a zhoubných nádorů v oblasti análního otvoru, penisu a vagíny. Práce na nové vakcíně byla umožněna objevem několika výzkumných týmů, že hlavní kapsidový protein L1 HPV je schopen se samovolně uspořádat do formy VLPs při produkci v eukaryotických produkčních systémech. Historie objevu vakcíny proti HPV je shrnuta v práci McNeil, 2006. Bylo zjištěno, že vakcíny založené na VLPs složených z L1 jsou schopné vyvolat silnou protilátkovou odpověď (Fausch et al., 2003), podobně jako VLPs složené z obou kapsidových proteinů L1 a L2 (Lenz et al., 2001).

Další pokusy, které mají za úkol odstranit hlavní nevýhodu těchto vakcín, absenci terapeutického efektu, se ubírají směrem vytvořit chimerické VLPs založené na kombinaci hlavních strukturních proteinů s onkogenními proteiny papilomaviru, či jejich částmi, jako jsou proteiny E2, E6, nebo E7 s cílem podpořit terapeutické vlastnosti vakcín (Greenstone et al.,

1998; Rudolf et al., 2001; Tobery et al., 2003). Současné trendy ve vývoji terapeutických vakcín proti HPV, které nejsou založeny na různých variantách VLPs jsou shrnuty v práci Hellner a Dorrell, 2017.

Vývoj vakcín proti HPV založených na VLPs lze rozdělit na dvě části, dvě generace vývoje. První generace vakcín se po jejich schválení FDA („Food and Drug Administration“) stala známá po celém světě. Jejich nákladný vývoj zahrnoval testy na zvířatech papilomavirových VLPs odvozených od příslušných zvířecích papilomavirů (Breitburd et al., 1995; Kirnbauer et al., 1996; Suzich et al., 1995). Po těchto úspěšných pokusech na zvířecích modelech se přistoupilo k testování na lidských dobrovolnících. Tyto pokusy vyústily v registraci dvojice komerčně dostupných vakcín Cervarix (GSK) - bivalentní vakcína, produkovaná v bakulovirovém expresním systému, založená na VLPs HPV-16 a 18. Druhá vakcína Gardasil (Merck), produkovaná v kvasinkovém expresním systému, je quadrivalentní vakcína obsahující, kromě již zmíněných dvou typů VLPs HPV-16 a 18 i VLPs odvozené od HPV-6 a 11, které jsou zodpovědné za téměř 90 % genitálních bradavic. Tyto vakcíny mají významný dopad na redukci onemocnění spojených s HPV a vykazují schopnost dlouhodobé ochrany proti vzniku rakoviny děložního čípku (Cadman, 2008). V současnosti je nejvíce problémů spojených s celosvětovým využitím. Celkem 85 % procent nových onemocnění je hlášeno z rozvojových zemí (WHO 2014). Mezi hlavní nevýhody vakcín první generace pro použití v těchto zemích patří jejich cena, nízká stabilita a prakticky žádný terapeutický efekt. Tyto problémy se snaží vyřešit vývoj druhé generace vakcín proti HPV.

Vakcíny druhé generace se snaží odstranit problémy vakcín první generace hlavně v oblastech produkční ceny a stabilizace VLPs, což souvisí se snížením distribučních nákladů. Vývoj orálních vakcín pak eliminuje nebezpečí šíření dalších infekčních chorob způsobených zejména opakovaným použitím injekčních jehel. Orální podání vakcín však, na rozdíl od injekčního podání, vyžaduje poměrně vysoké dávky antigenu pro vyvolání srovnatelného efektu. Jako alternativa se jeví podání těchto vakcín s adjuvans (Gerber et al., 2001; Rose et al., 1999). Slibnou cestou, jak snížit výrobní náklady se jeví produkce VLPs v rostlinných produkčních systémech ve formě hrubých extraktů (Pineo et al., 2013; Zahin et al., 2016). Produkce v rostlinných systémech s absencí nákladné purifikace antigenu je levnější než produkce v klasických eukaryotních produkčních systémech, jako například v kvasinkovém a bakulovirovém produkčním systému. Navíc byla zjištěna poměrně značná odolnost VLPs HPV chráněných celulózovou vrstvou při průchodu žaludkem (Rose et al., 1999). Dále lze snížit celkové náklady produkcí multivalentních vakcín působících profylakticky i proti typům

HPV-31, 33, 45, 52 a 58 (Serrano et al., 2012). Další z možností, jak zvýšit křížovou protekci HPV vakcín je zahrnutí strukturního proteinu L2, nebo jeho imunodominantních částí do vývoje vakcín. Protein L2 není, až do okamžiku vazby na bazální membránu exponován na povrchu kapsidy. Nejsou tedy proti němu produkovány neutralizační protilátky, nebo jen v malé míře. Nicméně studie provedená na ovcích imunizovaných L1/L2 VLPs odvozených od typů HPV-6, 16 a 18 prokázaly přítomnost subdominantního neutralizačního epitopu v N-koncové části proteinu L2, který je konzervován napříč různými typy HPV (Karanam et al., 2009; Roden et al., 2000). Nicméně většina protilátek indukovaných vakcínami na základě L1/L2 VLPs je namířena proti hlavnímu kapsidovému proteinu L1, což je pravděpodobně způsobeno jeho abundancí a faktem, že L2 protein se nachází uvnitř VLP. Tuto skutečnost se autoři snaží obejít vkládáním N-koncové části L2 do povrchových smyček L1 proteinu (Kondo et al., 2007; McGrath et al., 2013). Firma Xiamen Innovax Biotech, ve snaze vyvinout cenově dostupnou vakcínu, vyvíjí vakcínu založenou na VLPs složených z L1 proteinu HPV-16 a 18 produkovanou v bakteriálním expresním systému (Hu et al., 2014). Tato vakcína úspěšně prošla první a druhou fází klinického testování (Wu et al., 2015) a v současné době je ve třetí fázi klinické studie účinnosti.

Další registrovanou vakcínou založenou na VLPs pro použití v lidské medicíně je vakcína proti hepatitidě typu B (HBV), např. Recombivax (Merck) a Engerix (GlaxoSmithKline Biologicals). Mezinárodní zdravotnická organizace vydala doporučení na zařazení vakcíny proti HBV do dětského očkovacího kalendáře. V roce 2013 ji do svého očkovacího programu zařadilo celkem 90 % zemí (Meireles et al., 2015). Podrobnější informace o morfogenezi, funkci a aplikaci VLPs HBV jako vakcíny a diagnostických markerů jsou shrnuty v práci Hu a Liu, 2017.

Vakcína proti hepatitidě E (HEV) Hecolin (Xiamen Innovax Biotech) je zatím posledním představitelem registrované vakcíny založené na VLPs pro humánní medicínu. Celosvětově je evidováno celkem 14 milionů nakažených ročně. Největším nebezpečím je tato infekce pro těhotné ženy kde úmrtnost dosahuje až 20 % (Wu et al., 2012). Profylaktická vakcína Hecolin, licencovaná v Číně od roku 2011, je založena na zkráceném proteinu p239 produkovaném v bakteriální produkčním systému, který je schopen tvořit VLPs. Podrobnější informace a produkci, stabilitě a dalších vlastnostech lze získat v článku Zhang et al., 2014.

2.2.2 Využití VLPs ve vývoji veterinárních vakcín

Slibná technologie využití bezpečných vakcín založených na VLPs odvozených od patogenních virů, která se rozvíjí v lidské medicíně se díky dostupnosti a postupnému zlevňování produkce úspěšně přesouvá i do sféry veterinárního využití, kde je cena vakcíny závislá od komerční hodnoty zvířete. Cena vakcíny je tedy, na rozdíl od lidské medicíny, tím nejdůležitějším ukazatelem. I když je známo poměrně velké množství patogenních virů způsobujících onemocnění hospodářských zvířat, pouze jedna vakcína založená na VLPs je registrována ke komerčnímu použití. Jedná se o vakcínu namířenou proti prasečímu cirkoviru typu 2 (Porcine circovirus 2, PCV2). Nicméně z analýzy publikované vědecké literatury, kde se nachází velké množství článků o objevech a postupech produkce nových VLPs od hospodářky významných druhů virů a publikace, které hodnotí imunologické vlastnosti těchto kandidátních vakcín je patrné, že se jedná o dynamicky se rozvíjející problematiku. Příklady patogenních hospodářsky významných virů, od kterých jsou známy VLPs, a které jsou předmětem výzkumu za účelem vývoje vakcín, nebo jako nosičů imunogenních epitopů jiných veterinárních patogenních virů, chimérické VLPs, jsou přehledně shrnuty v pracích Crisci et al., 2012 a Liu et al., 2012. Počet těchto kandidátních vakcín se počítá na desítky a jejich počet dále stoupá.

2.2.3 Imunologické vlastnosti VLPs

Pokud porovnáme imunologické vlastnosti klasických subjednotkových vakcín s vakcínami založenými na VLPs, jsou VLP vakcíny často schopné vyvolat silnou protilátkovou a buněčnou odpověď dokonce i bez použití adjuvans. Ukazuje se, že VLPs, díky své podobnosti s nativním virem, vyvolávají množství „danger“ signálů schopných zapojit do procesu imunitní odpovědi i prvky vrozené imunity (Deml et al., 2005). Díky svému optimálnímu tvaru a velikosti jsou snadno endocytovány dendritickými buňkami (DC) a makrofágy a prezentovány prostřednictvím antigenů MHC I a MHC II (Zhang et al., 2004). Velmi důležité je, že mnohé VLPs mají schopnost účinně vyvolat maturaci DC a makrofágů, jakož i proliferaci dalších populací buněk imunitního systému (Sailaja et al., 2007).

2.2.3.1 Protilátková odpověď

Díky hustému upřádkání opakujících se epitopů jsou VLPs obecně silně imunogenní. Interakce mezi VLPs a buňkami prezentujícími antigen (APC), zejména DC, hrají klíčovou roli při zvyšování účinnosti imunitní odpovědi při vakcinaci pomocí VLPs (Zhang et al., 2004). Velké množství VLPs může být efektivně zachyceno pomocí APC, kde jsou jejich repetitivní epitopy zpracovány a následně dojde k provázání („cross-link“) povrchových imunoglobulinů

B-lymfocytů (BCR), čímž je indukován silný signál vedoucí k aktivaci B-buněk a rychlé T-nezávislé protilátkové odpovědi typu IgM (Jennings a Bachmann, 2008). *In-vitro* pokusy bylo zjištěno, že VLPs se mohou přímo vázat a interagovat s naivními B-lymfocyty, což pravděpodobně způsobuje expresi aktivačních markerů CD69 a CD86, aktivaci konvenčních B2 buněk a diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky s produkcí specifických protilátek. (Zhang et al., 2009).

2.2.3.2 Buněčná odpověď

APC mohou prezentovat peptidy derivované z VLPs na MHC I. To může vést k aktivaci naivních CD8⁺ T-lymfocytů umožněné „primingem“ CD8⁺ T-lymfocytů pomocí aktivačních signálů z DC buněk a následně aktivaci buněčné složky imunitní odpovědi zprostředkované cytotoxickými T-lymfocyty (CTL) i v nepřítomnosti replikujícího se viru. Aby se aktivovaly CD8⁺ T-lymfocyty, APC musí poskytovat vhodné kostimulační signály, které mohou být vyprovokovány určitými typy VLPs. Imunizace pomocí VLPs může aktivovat jak pomocné, tak cytotoxické T-lymfocyty (Morrow et al., 2012). Schopnost stimulace DC výrazně odráží schopnost VLPs indukovat odpověď CTL (Chackerian, 2007). CTL jsou v mnoha případech hlavní složkou boje s virovou infekcí a jinými vnitrobuněčnými patogeny (Grgacic a Anderson, 2006). Příklad úspěšně vyprovokované odpovědi CTL po imunizaci pomocí VLPs je uveden v práci Lechmann et al., 2001, kteří ukázali, že myši imunizované VLPs hepatitidy C vyvinuly virově specifickou buněčnou cytotoxickou odpověď, včetně odpovědi CTL a pomocných T-lymfocytů spojenou s produkcí interferonu gamma (IFN- γ). Zajímavostí je, že VLPs, které neobsahovaly protein virového core p7 indukovaly vyšší hladinu buněčné imunitní odpovědi s vyšším profilem aktivace Th1 než částice, které tento protein obsahovaly. Autoři Jeong a spolupracovníci ukázali, že paviáni imunizovaní VLPs hepatitidy C vyvinuli silnou buněčnou odpověď a až 45 % CD8⁺ T-lymfocytů vykazovalo aktivitu specifickou pro virus hepatitidy C (Jeong et al., 2004).

2.3 Polyomaviry

2.3.1 Obecná charakteristika

Polyomaviry, náležící do čeledi *Polyomaviridae*, jsou malé neobalené viry s genomem tvořeným dvouvláknovou kruhovou DNA o velikosti přibližně 5kbp a kapsidou o průměru 40–50 nm.

Tyto viry infikují zejména savce (např. vyšší primáty, hlodavce, králíky) (Dela Cruz et al., 2017), včetně člověka (Gheit et al., 2017). Dále jsou také patogenní pro ptáky (Circella et al., 2017), ryby (Peretti et al., 2015), hmyz a pavoukovce (Buck et al., 2016). Počátek studia

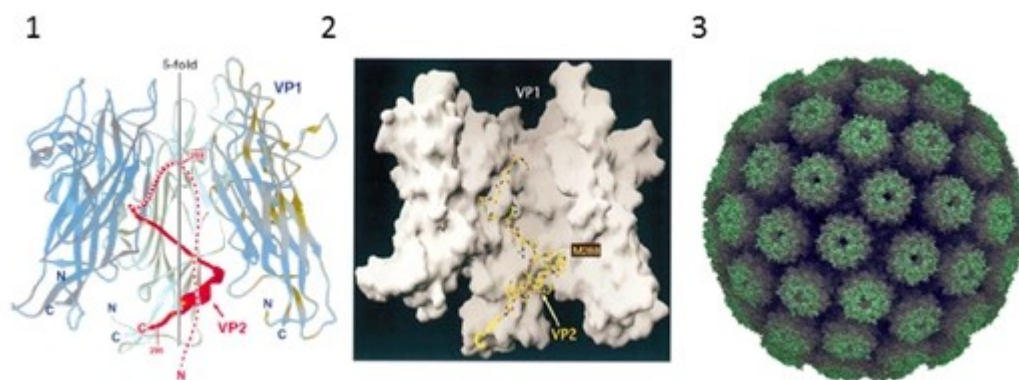
polyomavirů se datuje od roku 1953, kdy byl objeven myší polyomavirus (MPyV) (Gross, 1953). Tento virus má schopnost po inokulaci indukovat u novorozených nebo imunokomprimovaných myší různé typy nádorů a je od něj odvozen název celé čeledi. Sedm let po tomto objevu byl identifikován, jako kontaminanta poliovirové vakcíny produkované v tkáňové kultuře opičích buněk Simian virus 40 (SV40) (Sweet a Hilleman, 1960). Po jejich objevení byly tyto viry intenzivně studovány a sloužily jako modelové organismy pro studium karcinogeneze (Atkin et al., 2009) a různých molekulárně biologických-mechanismů, z nichž nejvýznamnější byly identifikace tumor supresorového genu p53 (Linzer a Levine, 1979), či fosforylace tyrosinu sloužící jako signalizační mechanismus (Eckhart et al., 1979). Značně také přispěly k poznání v oblasti produkce VLPs. Množství objevů nových druhů polyomavirů akcelerovalo kolem roku 2011 v souvislosti se vznikem „high throughput“ metod sekvencování a pokrokům v bioinformatice vedoucích k rychlému zpracování velkých objemů molekulárně-biologických dat. V současné době je známo přibližně 100 druhů polyomavirů. Posledním polyomavirem objeveným v čase psaní této práce byl polyomavirus infikující africké druhy hmyzožravých a plodožravých netopýrů (Carr et al., 2017). Tento obrovský nárůst počtu druhů vedl k revizi klasifikace polyomavirů (Viruses et al., 2016), založené zejména na podobnosti sekvencí genu pro LT antigen. V současné době jsou polyomaviry řazeny dle pravidel „International Comittee on Taxonomy of Viruses“ do celkem čtyř rodů: Alphapolyomavirus, Betapolyomavirus, Gammapolyomavirus a Deltapolyomavirus. I přes záplavu nových druhů můžeme říci, že mezi nejstudovanější zástupce polyomavirů, z hlediska využití VLPs, můžeme řadit pouze několik druhů shrnutých v následující tabulce (tab. 1).

Jméno viru	Hostitel	Původní izolace
Myší polyomavirus	Myš	(Gross, 1953)
Simian virus 40	Opice	(Sweet a Hilleman, 1960)
BK virus	Člověk	(Gardner et al., 1971)
JC virus		(Padgett et al., 1971)
Křeččí polyomavirus	Křeček	(Graffi et al., 1967)

Tabulka 1: Viry z čeledi Polyomaviridae, které jsou v současné době nejvíce studované v oblasti využití VLPs.

2.3.2 Stavba virionu a organizace genomu myšího polyomaviru

Neobalená kapsida s ikosahedrální symetrií $T=7$ a průměru cca 45nm je tvořena 72 pentamery (60 hexavalentními, 12 pentavalentními) hlavního kapsidového proteinu VP1. Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 nejsou vystaveny na povrchu kapsidy. Jsou asociovány hydrofobními interakcemi a vodíkovými můstky k centrálním dutinám pentamerů VP1 a směřují dovnitř virionu (Chen et al., 1998). V každé dutině VP1 pentameru je jedna molekula VP2, nebo VP3, i když podle některých zdrojů by se zde mohla nacházet i dvojice minoritních proteinů (Schowalter a Buck, 2013). C-koncové části proteinů VP1 zprostředkovávají interakce zodpovědné za vazbu pentamerů mezi sebou (Stehle a Harrison, 1997). Virion je dále stabilizován vápenatými ionty a disulfidickými vazbami (Brady et al., 1977; Stehle a Harrison, 1997). Struktura pentameru VP1 a kapsidy MPyV je znázorněna na obr. 5.

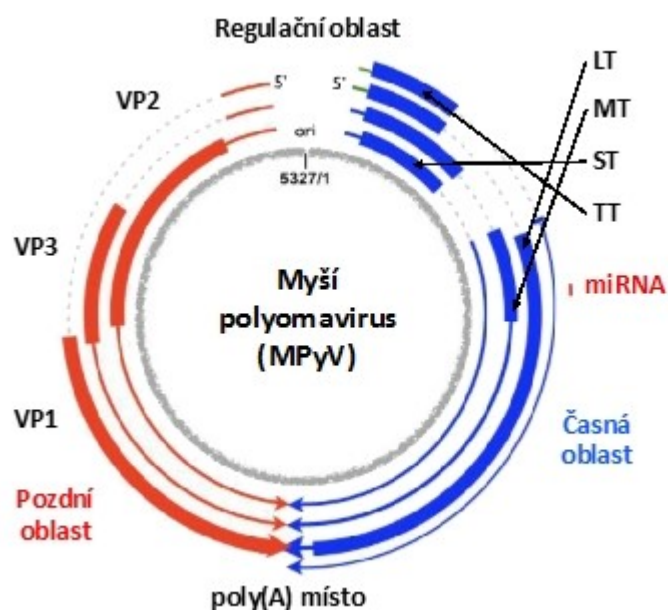


Obrázek 5: Stavba pentameru a virionu MPyV.

1, 2 Model proteinu VP1 a minoritního proteinu v dutině pentameru, modře – VP1, červeně VP2, nebo VP3, přerušovaná linie ukazuje část unikátní pro protein VP2 (převzato z Chen et al., 1998).

3 Model virionu MPyV (převzato a upraveno z Stehle a Harrison, 1996).

Genom myšího polyomaviru je tvořen kruhovou, dvouvláknovou DNA, která je v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3, H4 a hlavním kapsidovým proteinem VP1 na místě histonu H1 s jejichž pomocí je uspořádána do struktury kondenzovaného virového minichromozómu. Virový genom můžeme z hlediska životního cyklu polyomavirů rozdělit na časnou, pozdní a nekódující regulační oblast (obr. 6). Regulační oblast obsahuje počátek replikace, promotory a enhancery transkripce.



Obrázek 6: Organizace genomu MPyV.

Geny časné fáze jsou znázorněny modře, geny pro pozdní oblast červeně. Počátek replikace a regulační oblast genomu jsou znázorněny na vrcholu obrázku genomu. Tenké linie představují transkripty, silné linie otevřené čtecí rámce (ORF), tečkovanými liniemi jsou znázorněny introny. LT, MT, ST, a TT – velký, střední, malý a „tiny“ T antigen. Převzato a upraveno z Carmichael, 2016.

Časná oblast, která je transkribována ihned po vstupu viru do jádra a jejíž transkripce přetrvává až do pozdních fází infekce, kóduje geny pro nestrukturní regulační proteiny – tumorové T antigeny, jako jsou velký a malý T antigen (LT, ST) a u hlodavčích polyomavirů střední T antigen (MT) a „tiny“ T antigen (Garren et al., 2015; Riley et al., 1997) Všechny čtyři T antigeny jsou translatovány z mRNA vznikající alternativním sestřihem ze společného transkriptu a mají společnou N-koncovou část. Jejich funkcí je indukce přechodu buňky do S-fáze buněčného cyklu a podílejí se na transkripci a replikaci virové DNA.

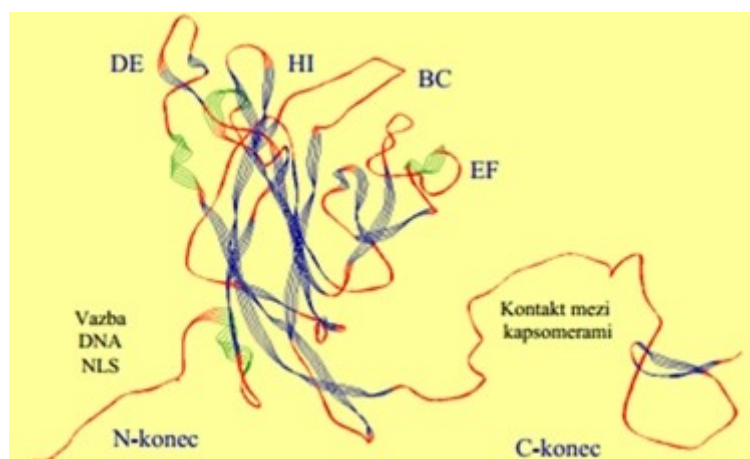
Po zahájení replikace genomu je spuštěna transkripce genů pozdní fáze běžící z druhého řetězce DNA v opačném směru, než běží transkripce časné oblasti. Tato oblast kóduje geny pro tři strukturní proteiny polyomavirů – VP1, VP2 a VP3, které se podílejí na stavbě virové kapsidy. Všechny tři mRNA pro kapsidové proteiny vznikají alternativním sestřihem, podobně jako mRNA pro T antigeny v časné oblasti, ze společné pre-mRNA, která je extrémně dlouhá, dosahuje několikanásobné délky celého genomu (Acheson, 1978). Gen kódující VP3 je celý obsažen v sekvenci genu pro VP2. Oba geny jsou translatovány ze stejného čtecího rámce. VP3 je tedy shodný s C-koncovou částí VP2. Oblast kódující C-koncovou část VP2 a VP3 se překrývá s oblastí kódující N-koncovou část VP1. VP1 je však translatován z jiného čtecího rámce, takže překrývající se oblasti mají jiné aminokyselinové složení.

2.3.3 Vlastnosti strukturních proteinů myšího polyomaviru

2.3.3.1 Hlavní kapsidový protein VP1

Protein VP1 o molekulové hmotnosti 45 kDa je hlavní stavební jednotkou virové kapsidy. Základním stavebním prvkem je kapsomera, která je tvořena pěti molekulami proteinu VP1. VP1 je multifunkční protein, který má kromě strukturní funkce i řadu dalších funkcí, jako např. interakce s buněčnými receptory. Těmito receptory jsou gangliosidy GD1a, GT1b (Tsai et al., 2003) a GT1a (Buch et al., 2015). Protein VP1 interaguje s kyselinou sialovou na jejich povrchu zejména díky BC a HI smyčkám (Stehle a Harrison, 1997). Bylo rovněž popsáno, že se účastní i vazby na ko-receptor $\alpha 4\beta 1$ integrin (Caruso et al., 2003), čímž umožňuje internalizaci buňkou. Další vlastností je schopnost vázat se na jadernou matrix a přispívat k zahájení časně transkripce (Carbone et al., 2004).

Strukturní a funkční vlastnosti můžeme rozdělit do tří částí molekuly VP1, (obr. 7)



Obrázek 7: Terciární struktura monomeru VP1.

β -listy – modře, α -helixy – zeleně. Flexibilní smyčky DE, HI, BC a EF jsou vystavené na povrch kapsidy. N-konec orientovaný do nitra kapsidy nese jaderný lokalizační signál. C-koncová část molekuly zprostředkovává kontakt mezi kapsomery. Upraveno dle Liddington et al., 1991.

N-koncová část, orientovaná dovnitř kapsidy, obsahuje 15 aminokyselin NLS a DNA vazebnou doménu, která nespecificky váže DNA (Chang et al., 1993, 1992; Moreland a Garcea, 1991). Střední část VP1 je tvořena α -helixy a β -listy, které jsou spojeny smyčkami – BC, DE, HI, EF, FG a G2. Smyčky BC, DE a HI jsou exponovány na povrch kapsidy a uplatňují se během adsorpce virionů na povrch buněk. Smyčka EF je spolu s C-koncovou částí součástí vazebného místa pro Ca^{2+} (Liddington et al., 1991). C-konec proteinu VP1 je flexibilní a odpovědný za vazbu mezi kapsomery (pentamery VP1) kapsidy. Protein VP1 prochází řadou postranlačních modifikací, jako například fosforylace, sulfatace, acetylace, hydroxylace a

metylace (Bolen et al., 1981). Jednou z nejdůležitějších modifikací je fosforylace serinů a threoninů. Fosforylace threoninů (Thr-63, Thr-156) nacházejících se na povrchových smyčkách BC a DE, má vliv na morfogenezi virionu a vazbu receptoru na povrchu buňky. Nutnou podmínkou pro správnou fosforylaci VP1 je přítomnost MT antigenu, který aktivuje buněčné kinázy (Garcea et al., 1985; Li a Garcea, 1994) a přítomnost minoritních proteinů, zejména proteinu VP2 (Forstová et al., 1993; Li et al., 1995). Vazbou VP2 k pentameru VP1 pravděpodobně dochází ke změně jeho konformace a tím k zpřístupnění aminokyselinových zbytků pro kinázy. O fosforylaci na serinech VP1 toho není příliš známo, neboť virové mutanty s deletovanými seriny nejsou životaschopné. Výjimku tvoří fosforylace serinu-66, která se podílí na interakcích mezi jednotlivými kapsomerami. Za další významnou modifikaci můžeme označit metylaci lyzinových a argininových zbytků na N-konci VP1, která pravděpodobně usnadňuje vazbu na DNA (Burton a Consigli, 1996).

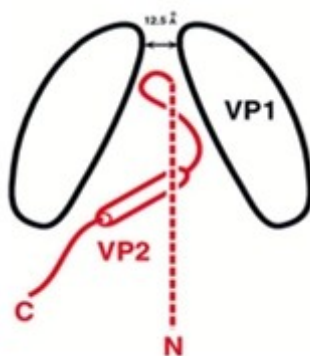
Multifunkčnost proteinu VP1 se projevuje i ve schopnosti interagovat s řadou buněčných proteinů. Mezi nejdůležitější popsané interakce patří interakce s chaperonem Hsp70 (Chromy et al., 2006). Předpokládá se, že protein Hsp70 se podílí na vzniku správné konformace proteinu VP1 a může se podílet na skládání virionu *in-vivo*. Protein VP1 interaguje s proteinem Hsp70 i v časných fázích infekce, tedy při pohybu vstupujících virionů buňkou. Při pokusech *in-vitro*, se prokaryotické i eukaryotické chaperony Hsp70 efektivně podílely na rozvolňování polyomavirové částice, což může být krok vedoucí k produktivní infekci (Chromy et al., 2006). Další buněčný protein, se kterým VP1 interaguje je transkripční faktor YY1, který přímo interaguje s DE smyčkou VP1 (Palková et al., 2000b). Předpokládanými funkcemi YY1 je rozpoznávání virové DNA a její zabalení do virionu a vazba nukleoproteinových komplexů k jaderné matrix. Stále je otázkou, jakým způsobem je rozpoznána virová DNA, která má být zabalena do virionu. U příbuzného viru SV40 byla v regulační oblasti virového genomu nalezena tzv. SES sekvence („SV40 encapsidation sequence“), která slouží jako signál pro zabalení virové DNA do virionu (Oppenheim et al., 1992). Význam interakce YY1 s genomem a hlavním kapsidovým proteinem se ukázal při studiu virů mutovaných v DE smyčce proteinu VP1, u kterých došlo ke snížení účinnosti enkapsidace virové DNA (Garcia et al., 2000).

Značný význam má také interakce VP1 s buněčnými karyoferiny, které mohou mít kromě transportní funkce do jádra i funkci chaperonů. DNA kompetuje s karyoferiny o pentamery VP1 a VP1 pentamery s navázanými karyoferiny nejsou schopny *in-vitro* tvořit

částice. Předpokládá se, že díky této interakci mohou karyoferiny ve funkci chaperonů *in-vivo* regulovat skládání virionů (Bird et al., 2008).

2.3.3.2 Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3

Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou translatovány ze stejného čtecího rámce, to znamená, že sekvence kratšího VP3 (23 kDa) je celá obsažena v C-koncové části VP2 (35 kDa). Minoritní proteiny interagují s VP1, čímž ovlivňují jeho postranlační modifikace (viz kap. Hlavní kapsidový protein VP1). Minoritní proteiny nejsou přístupné z povrchu kapsidy, nachází se v centrální dutině pentameru VP1. Přesná pozice minoritních proteinů uvnitř dutiny pentameru není zcela objasněna – předpokládá se, že jejich C-konec směřuje do dutiny pentameru, kde je ukotven hydrofobním helixem. Zbylá část minoritních proteinů je značně flexibilní, patrně tvoří smyčku v dutině pentameru a N-konec minoritních proteinů směřuje zpět směrem k nukleocore, (obr. 8), (Barouch a Harrison, 1994; Chen et al., 1998).



Obrázek 8: Schematické znázornění pozice VP2 v dutině pentameru VP1.

Zobrazeny jsou dvě molekuly VP1 v pentameru. Upraveno podle Chen et al., 1998.

Protein VP2 je na svém N-konci myristylován (Krauzewicz et al., 1990; Streuli a Griffin, 1987). Tato modifikace je patrně důležitá pro zachování správné konformace virionu a reinfekci (Mannová et al., 2002). Funkce minoritních proteinů není příliš jasná. Jejich absence v mutantních vironech se projeví ztrátou infekтивности již v časných fázích životního cyklu (Mannová et al., 2002). U minoritních proteinů byly nalezeny hydrofobní transmembránové domény, dvě u VP3 a třetí v unikátní části VP2 (Rainey-Barger et al., 2007). Díky těmto hydrofobním doménám mohou mít minoritní proteiny funkci viroporinů a uplatňovat se v procesech uvolňování virového potomstva nebo při dopravě virového genomu do jádra hostitelské buňky (Huerfano et al., 2010; Huérfano et al., 2017).

2.4 Chimérické VLPs polyomavirů a jejich využití (s důrazem na VLPs MPyV)

Hlavní kapsidový protein VP1 MPyV je schopen se velmi účinně samouspořádat do struktur VLPs při produkci v hmyzích nebo kvasinkových buňkách, nebo *in-vitro*, z pentamer VP1 po produkci v bakteriích *E. coli* (Forstová et al., 1993; Montross et al., 1991; Salunke et al., 1986). V posledních letech vznikla řada prací zabývajících se využitím VLPs MPyV a struktur od nich odvozených. Kromě dopravy léčiv a diagnostických látek do buněk a tkání a níže zmíněné dopravy DNA do buněk, je zde široká možnost modifikace těchto VLPs pro použití v imunoterapii. Jednou z možností je vkládání cizích epitopů do povrchových smyček proteinu VP1. Druhou možností je vkládání poměrně velkých epitopů a celých proteinů, řádově desítky kDa, dovnitř kapsidy. Další možností je fúzovat cizí epitopy s C-koncem proteinu VP1. Protože je však C-koncová část proteinu VP1 zodpovědná za vazbu mezi kapsomerami, je tvorba VLPs vážně narušena, nebo znemožněna. Dochází pak pouze ke skládání pentamerů z proteinu VP1.

2.4.1.1 Využití VLPs odvozených od polyomavirů pro přenos DNA

Díky unikátním vlastnostem VP1 polyomavirů, jako je přítomnost NLS, schopnost samouspořádat se do VLPs, rozpoznávat receptory na povrchu buněk nebo nespecificky vázat DNA, byla zkoumána schopnost VLPs dopravit cizorodou DNA do buněk a sloužit tak jako nástroj pro genovou terapii. Oproti jiným virovým vektorům, které se používají pro genovou terapii mají VLPs tu výhodu, že nezanášejí do genomu cílových buněk virovou genetickou informaci (Krauzewicz a Griffin, 2002), navíc jsou schopné vstoupit efektivně do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou. Jako slibné se pro tento účel jeví VLPs odvozené od MPyV, a to díky absenci preexistující imunity v lidské populaci. Proveditelnost genového přenosu pomocí infekce provedené VLPs polyomavirů byla prokázána v práci Forstová et al., 1995. VLPs MPyV jsou schopné vstoupit do celé řady buněčných typů, včetně lidských a zajistit expresi vneseného genu (Forstová et al., 1993; Heidari et al., 2002; Krauzewicz et al., 2000a; Soeda et al., 1998; Stokrová et al., 1999). Velikost nahé DNA, kterou jsou VLPs MPyV schopné pojmout je cca 3 kbp (Forstová et al., 1995). V případě, že je DNA v komplexu s histony, zvýší se kapacita částice na 5 kbp, což odpovídá velikosti genomu polyomavirů (Gillock et al., 1997; Palková et al., 2000a). Bylo ukázáno, že pokusné VLPs MPyV nesoucí cizorodou DNA jsou schopné vstoupit do širokého spektra tkání a orgánů zvířat, včetně mozku (Krauzewicz et al., 2000a). Zároveň bylo také pozorováno, že účinnost dopravy DNA enkapsidované uvnitř VLPs je velmi nízká, zvláště pak u synchronizovaných buněk. Avšak i při infekci buněk MPyV je pouze malá část buňkou internalizovaných částic schopna

doprovázet virové genomy do jádra (Mannová a Forstová, 2003; Richterová et al., 2001). Byly popsány dvě hlavní možné cesty k jádru používané jak viriony MPyV, tak VLPs MPyV. Jedna je závislá na mikrotubulech, druhá na aktinových vláknech. Pouze dráha využívající mikrotubuly vedla k účinnému přenosu virových genomů. Transport zprostředkovaný aktinem se ukázal jako neproduktivní dráha (Krauzewicz et al., 2000b). Zatímco účinnost adsorpce a internalizace se mezi VLPs MPyV a viriony infekčního viru podle pozorování mikroskopickými metodami (Richterová et al., 2001) v ničem neliší, efekt úspěšného dopravení DNA do jádra je rozdílný. Molekuly DNA nesené VLPs MPyV, dosáhnou jádra patrně během buněčného dělení. Je to zřejmě způsobeno absencí minoritních proteinů VP2 a VP3, které hrají zásadní roli v infektivitě viru (Huérffano et al., 2017; Mannová et al., 2002).

VLPs MPyV jsou vysoce imunogenní, což způsobuje problémy při opakovaném přenosu cizorodé DNA (Clark et al., 2001). Schopnost vázat a přenášet DNA do buněk byla testována i u jiných zástupců polyomavirů, např. VLPs odvozené od virů BKV (Touzé et al., 2001), JCV (Goldmann et al., 1999; Ou et al., 1999), SV40 (Kimchi-Sarfaty a Gottesman, 2004), či křeččího polyomaviru (HaPyV) (Voronkova et al., 2007). Účinnost exprese vnesených genů však byla podobně nízká jako u VLPs MPyV.

2.4.1.2 Využití VLPs odvozených od polyomavirů v imunoterapii

2.4.1.2.1 Epitopy cizorodých proteinů vložené na povrch VLPs

Jednou z možností je vkládání cizích epitopů do povrchových smyček proteinu VP1, což zajistí expozici cizího epitopu na povrchu kapsidy a jeho dobrou přístupnost složkám imunitního systému. Flexibilita těchto smyček umožňuje vloženému epitopu zaujmout nativní konformaci. Tento přístup má svá omezení ve velikosti vkládaného epitopu na 20 až 40 aminokyselin, větší inserce mají negativní dopad na stabilitu kapsidy (Gleiter et al., 1999; Gleiter a Lilie, 2001; Stubenrauch et al., 2001). Neugebauer et al., 2006 vložili do povrchové smyčky BC a postranní smyčky FG proteinu VP1 dva epitopy proteinu hemocyaninu (12 a 14 aminokyselin), u kterého je známo, že vzbuzuje silnou imunitní odpověď u prasat. U některých konstruktů fúzovali k C-konci proteinu VP1 ještě streptavidin pro snazší izolaci. Tím ovšem porušili schopnost VP1 skládat se do kapsid a obdrželi pouze pentamery. Schopnost VLPs a pentamer vyvolat imunitní odpověď proti neseným epitopům pak testovali na zvířatech. U všech zvířat došlo k vyvolání specifické protilátkové odpovědi, silnější u VLPs a slabší u pentamer. Také se ukázalo, že silnější imunitní odpovědi se docílí vložením epitopů do povrchové smyčky BC než do postranní smyčky FG proteinu VP1. Skrastina et al., 2008, ve snaze připravit alternativu k vakcíně proti HBV, vložili epitop obalového proteinu S1 o velikosti

75 aminokyselin do HI smyčky VP1 MPyV. Tento epitop proteinu S1 je přímo zodpovědný za vazbu na lidské hepatocyty a není přítomen v již registrované vakcíně proti HBV založené na VLPs, což nabízí možnost vývoje vícesložkové vakcíny. Při pokusech na myších bylo dosaženo nejen silné protilátkové odpovědi proti vloženému epitopu, ale i stimulace produkce interleukinu 12 (IL-12) a IFN- γ . V podobném pokusu, kdy byly vloženy epitopy odvozené od proteinu S1 HBV do povrchových smyček VP1 křeččího polyomaviru (HaPyV) (Gedvilaite et al., 2000), bylo dosaženo silné protilátkové odpovědi proti vloženému epitopu, ne však zvýšené produkce IL-12 a IFN- γ . Pokusy s vkládáním epitopů cizích proteinů do povrchových smyček proteinu VP1 HaPyV prováděla ještě Ulrichova skupina (Dorn et al., 2008; Gedvilaite et al., 2004; Lawatscheck et al., 2007). Ve snaze vyvinout alternativní vakcínu proti chřipce typu A byly zkonstruovány chimerické VLPs odvozené od viru SV40 vložením epitopu CTL HLA-A o délce 8 aminokyselin do povrchových smyček DE a HI (Kawano et al., 2014). Tyto chimerické VLPs efektivně vyvolaly odpověď CTL proti viru chřipky typu A.

2.4.1.2.2 Epitopy, či celé peptidy vložené dovnitř VLPs

Druhou možností je vkládání poměrně velkých epitopů a celých proteinů, řádově desítky kDa, dovnitř kapsidy. Cizí protein je fixován uvnitř VLPs fúzí s minoritním kapsidovým proteinem (VP2, nebo VP3), nebo s jeho C-koncovou částí, která je odpovědná za interakci s dutinou VP1 pentameru. Vkládání epitopů nebo celých proteinů dovnitř kapsidy může být spojeno s nízkou hladinou protilátkové imunitní odpovědi. Nicméně bylo ukázáno, že pro účinnou odpověď CTL není potřeba, aby epitop byl přístupný na povrchu chimerických VLPs. Příkladem může být práce Bickert et al., 2007a, kde tento typ VLPs založený na polyomavirech, které uvnitř obsahovaly CD8⁺ imunodominantní epitop odvozený z ovalbuminu, indukovaly CD8⁺ a CD4⁺ specifickou odpověď proti ovalbuminu a byly schopny zajistit ochranu myši před nádory exprimujícími ovalbumin (Brinkman et al., 2004). Vkládání cizích epitopů, nebo celých proteinů dovnitř kapsidy bylo demonstrováno i v naší laboratoři (Boura et al., 2005; Fric et al., 2008), kdy byla molekula EGFP („Enhanced Green Fluorescent Protein“) připojena k N-konci zkráceného proteinu VP3 (tVP3) a fúzovaný protein byl spolu s proteinem VP1 produkován v bakulovirovém expresním systému. Chimérické kapsidy indukovaly po intranasální aplikaci produkci IL-12 a IFN- γ (Fric et al., 2008). Hrusková et al., 2009 vložili na podobném principu do VLPs fragment fúzního proteinu BCR-ABL vyskytujícího se u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Tyto chimérické VLPs však nevykázaly specifickou odpověď CTL proti BCR-ABL. Abbing et al., 2004 fúzovali zelený fluorescenční protein (GFP) s N-koncem celého minoritního kapsidového proteinu VP2. Takto fúzovaný GFP byl zabalen dovnitř VLPs *in-vitro* po produkci proteinů VP1 a fúzního proteinu GFP-VP2 v bakteriích *E. coli*. Tegerstedt et al.,

2005 fúzovali 683 aminokyselin dlouhý fragment lidského proteinu Her2/neu k N-konci proteinu VP2. V takto připravených VLPs byly přichyceny v průměru jeden až tři fúzní proteiny na částici. I přes nízký počet epitopů v částicích, vyvolaly tyto VLPs protektivní imunitu u myši. Podobné výsledky byly publikovány i v práci Andreasson et al., 2010, která byla ovšem založená na částicích odvozených od myšího pneumotropního viru (MPtV), který může být použit v kombinaci, či jako alternativa k MPyV díky neexistující křížové reaktivitě protilátek proti těmto virům.

2.4.1.2.3 Nosiče peptidů, či celých proteinů založené na pentamerech VP1

Další možností je fúzovat cizí epitopy s C-koncem proteinu VP1. Protože je však C-koncová část proteinu VP1 zodpovědná za vazbu mezi pentamery VP1, je tvorba VLPs vážně narušena, nebo znemožněna. Dochází pak pouze ke skládání jednotlivých pentamerů (kapsomer) z proteinu VP1. Ve společné publikaci naší a švédské laboratoře, byla na C-konec proteinu VP1 připojena glutathion-S-transferáza (Vlastos et al., 2003). Bylo ukázáno, že vzniklé pentamery tohoto fúzního proteinu vstupovaly účinně do buněk a indukovaly v myších protilátkovou odpověď, i když na rozdíl od VP1VLPs nechránily myši před polyomavirovou infekcí. Brinkman et al., 2004 navázali krátký epitop ovalbuminu na C-konec proteinu VP1. Zde ještě docházelo k tvorbě VLPs. Bickert et al., 2007b ukázali, že tyto chimerické kapsidy indukovaly CD8⁺ a CD4⁺ T buněčnou odpověď specifickou pro nesený antigen. Nicméně, když stejná vědecká skupina zkonstruovala rekombinantní protein VP1 na C-konci fúzovaný s epitopem proteinu TRP2 („tyrosinase-related protein 2“), docházelo již pouze k tvorbě pentamerů, které se do VLPs neskládaly (Brinkman et al., 2005). V práci Neugebauer et al., 2006 využili autoři VP1 MPyV pentamery jako nosiče různých B-lymfocytárních epitopů, které však v tomto případě nefúzovali s C-koncem proteinu VP1, ale vkládali je do povrchové BC smyčky. Prokázali, že chimérické pentamery indukovaly silnou, dlouho trvající protilátkovou odpověď srovnatelnou s dosud standartním nosičem imunogenních peptidů, jako je KLH (keyhole limpet hemocyanin).

2.5 Cirkoviry - obecná charakteristika

Prvním popsáním cirkovirem byl prasečí cirkovirus typu 1 (PCV1), který byl objeven jako kontaminanta prasečích ledvinových buněk PK15 v roce 1974 a je morfologicky podobný picornavirům. Později, v roce 1982, byl tento virus identifikován jako samostatný druh a zařazen do rodu *Circovirus*, čeledi *Circoviridae* (Tischer et al., 1982). Posléze se zjistilo, že PCV1 je celosvětově rozšířený, není však spojen s žádným typem onemocnění prasat. Postupem času byl objeven u nemocných prasat další prasečí cirkovirus. Na DNA úrovni

vykazoval 68 % homologii s již zmíněným PCV1 (Hamel et al., 1998) a bylo jej možné zachytit pomocí DNA sond určených pro PCV1. Nicméně při použití monoklonálních protilátek připravených proti PCV1 se zjistilo, že nový typ viru je po antigenní stránce odlišný (Allan et al., 1998). Nejasnosti ohledně tohoto neznámého viru byly vyřešeny porovnáním s genomy virů izolovaných z nemocných prasat z Evropy a Severní Ameriky, kde byla zjištěna až 96 % homologie na úrovni DNA a tento virus byl pojmenován jako prasečí cirkovirus typu 2 (PCV2) (Meehan et al., 1998). Později bylo fylogenetickými studiemi zjištěno, že oba viry pochází ze společného předka (Olvera et al., 2007).

V roce 2016 byl v USA objeven zatím poslední patogenní zástupce prasečích cirkovirů, prasečí cirkovirus 3 (PCV3) (Palinski et al., 2017). Výskyt PCV3 byl dále zaznamenán na farmách v Číně (Ku et al., 2017) a Polsku (Stadejek et al., 2017).

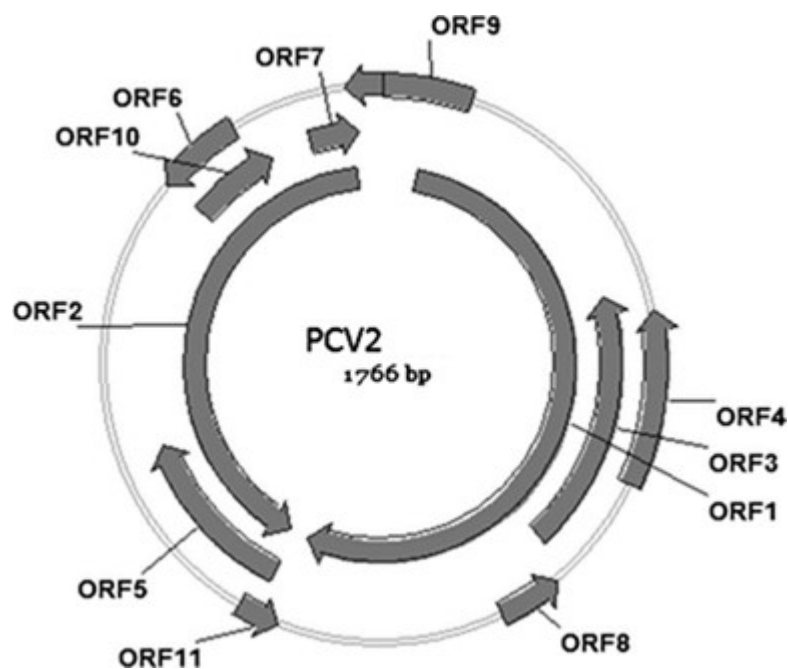
Kromě již zmíněných prasečích cirkovirů tato čeleď zahrnuje z dalších zástupců např. virus onemocnění zobáku a peří papoušků („Psittacine Beak and Feather Disease“, PBFD), holubí cirkovirus („Pigeon circovirus“, PiCV), kanárčí cirkovirus („Canary circovirus“, CaV) a husí cirkovirus („Goose circovirus“, GoCV) (Finsterbusch a Mankertz, 2009). V této čeledi jsou zastoupeny, kromě rostlinných virů, také patogeny člověka jako jsou TTV virus („transfusion-transmitted virus“), SEN virus a TTV-like minivirus (McKeown et al., 2004; Nishizawa et al., 1997; Umemura et al., 2001).

2.5.1 Prasečí cirkovirus 2

Virus PCV2 se vyskytuje v několika genotypech - PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d (Franzo et al., 2015) a PCV2e (F. Wang et al., 2009). Zatímco PCV2a byl dominantním genotypem v Evropě do roku 2000, později se stal dominantním genotypem PCV2b (Cortey et al., 2011). Vzhledem k tomu, že genom PCV2 je jednovláknová DNA s mutačním potenciálem, a k evolučnímu tlaku, který představuje vakcinace v chovech prasat, se dá očekávat vznik dalších genotypů. Varianta PCV2c byla identifikována v archivních vzorcích tkání pocházejících z Dánska (Dupont et al., 2008) a v zárodcích prasat v Brazílii. Genotypy PCV2d a PCV2e byly identifikovány v chovech prasat v Číně či USA (Guo et al., 2010; F. Wang et al., 2009; Xiao et al., 2015)

2.5.1.1 Organizace genomu PCV2

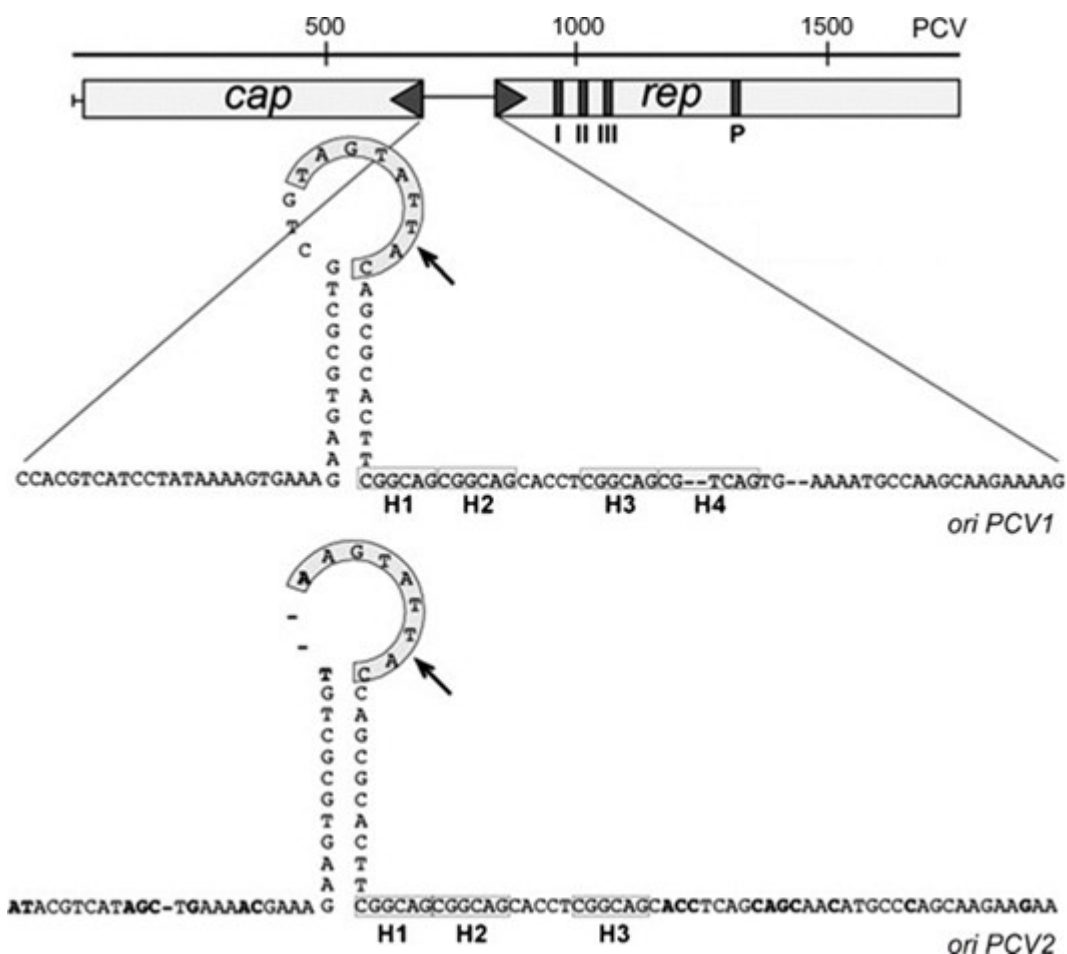
Genom PCV2 je tvořen jednovláknovou kruhovou DNA o velikosti cca 1,8 kb, která je uzavřená v kapsidě s ikosahedrální symetrií T=1 a průměru 16-18 nm. V genomu PCV2 bylo objeveno až 11 otevřených čtecích rámců (ORF), (obr. 9).



Obrázek 9: Schéma polohy otevřených čtecích rámců v genomu PCV2.

Pouze u ORF1-4 byly experimentálně ověřeny genové produkty, které jsou studovány jako funkční proteiny. Převzato a upraveno z Ren et al., 2016.

Pouze čtyři ORF byly dosud experimentálně potvrzené. V genomu PCV2, se nachází dvě intergenové oblasti oddělující dva hlavní ORF. Nachází se zde nukleotidový motiv konzervovaný mezi PCV1 a PCV2 (Hamel et al., 1998), který má významnou úlohu při replikaci genomu (Mankertz et al., 2003), (obr. 10).



Obrázek 10: Uspořádání genomu PCV1 a PCV2.

Konzervovaná intergenová oblast obsahuje vlásenkovou strukturu s osmi-nukleotidovou sekvencí označenou šipkou a repetitivní sekvence H1-4. Tyto sekvence hrají důležitou úlohu při replikaci genomu. I-III – konzervované oblasti v sekvenci REP proteinu důležité pro amplifikaci DNA metodou valivé kružnice; P – DNA vazebná doména. Převzato z Finsterbusch a Mankertz, 2009.

2.5.1.2 Virové proteiny PCV2

Z ORF1 jsou po alternativním sestřihu produkovány vysoce konzervované proteiny nezbytné pro virovou replikaci (Mankertz et al., 2003). V promotorové oblasti byl identifikován virový ISRE prvek („interferon-stimulated response element“), který má důležitou úlohu ve virové transkripci. Nejdůležitější proteiny z ORF1 jsou označovány jako Rep a Rep0 a jsou klíčové pro replikaci. Obsahují DNA vazebnou doménu, mají endonukleázovou aktivitu a nukleotidyl transferázovou aktivitu (Vega-Rocha et al., 2007). Rep proteiny mají 3 potenciální N-glykosylační motivy, první dva usnadňují replikaci virové DNA, zatímco u třetího motivu byl prokázán vliv na inhibici replikace v prasečích ledvinových buňkách PK15 (Shi et al., 2015). Dále byly detekovány pouze RNA produkty, ke kterým nebyly nalezeny proteiny - označovány jako Rep3a Rep3b, Rep3c, NS515, NS672 a NS0 (Cheung, 2003a; Lv et al., 2014),

u kterých bylo cílenou mutagenezí prokázáno, že nejsou nutné pro úspěšnou replikaci virového genomu, ale mohou mít vliv na patogenitu viru (Cheung, 2003b).

Druhý otevřený čtecí rámec (ORF2) kóduje kapsidový protein Cap o velikosti 30 kDa (233 aminokyselin), který je hlavním imunogenem viru (Finsterbusch a Mankertz, 2009; Lv et al., 2014; Nawagitgul et al., 2000). Při heterologní produkci proteinu Cap bylo zjištěno, že je schopen se nepříliš účinně skládat do VLPs o průměru 17-20 nm, což odpovídá i velikosti infekční virové částice. Kapsida je tvořena 60 molekulami kapsidového proteinu Cap uspořádaných do 12 pentamer (Crowther et al., 2003). Na N-konci proteinu Cap se nachází sekvenčně nespecifická DNA vazebná doména s vysokým obsahem bazických aminokyselin (Finsterbusch et al., 2009), které vytvářejí NLS umožňující transport proteinu Cap do jádra, zatímco Cap zkrácený o 41 aminokyselin na N-konci je lokalizován v cytoplasmě (Qiang Liu et al., 2001). Cap je multifunkční protein s dalšími funkcemi. Příkladem může být interakce s virovým proteinem Rep, která je klíčová pro virovou replikaci (Timmusk et al., 2006). Tato interakce by mohla být důvodem rozdílné virulence subtypů PCV2 (Cheung a Greenlee, 2011; Krakowka et al., 2012).

Genový produkt ORF3 není nezbytný pro replikaci viru, ale hraje významnou roli v patogenezi viru (Chaiyakul et al., 2010). Interaguje s řadou buněčných proteinů a podílí se na indukci apoptózy infikovaných buněk (Liu et al., 2007, 2006, 2005). Protein ORF3 umožňuje rychlé šíření virionů díky jejich rychlému uvolňování z infikovaných buněk. PCV2 postrádající ORF3 vykazují sníženou patogenitu (Karuppannan a Kwang, 2011).

Protein nazvaný ORF4 není stejně jako ORF3 nezbytný pro replikaci viru. ORF4 ovlivňuje funkci ORF3, neboť virus s deletovaným ORF4 vykazuje mnohem vyšší podíl apoptózy u infikovaných buněk (Gao et al., 2014; Lv et al., 2016).

2.5.2 Patologie PCV2

PCV2 je patogenní virus působící velké ekonomické ztráty v chovu prasat. Infekce PCV2 je spojena s multifaktoriálním onemocněním „PCV2-systemic disease“ (PCV2-SD), dříve označovaného jako syndrom chřadnutí selat po odstavu (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), (obr. 11). Toto onemocnění se poprvé objevilo v roce 1991 v severní Americe (Clark et al., 1997) a poté se rozšířilo do celého světa. Souhrnně lze říci, že PCV2-SD je heterogenní skupina onemocnění (Grau-Roma et al., 2011). Za variabilitou jednotlivých onemocnění stojí schopnost viru napadat buňky imunitního systému (Mandrioli

et al., 2004) nebo ovlivňovat imunitní systém hostitele (Kekarainen et al., 2008). PCV2-SD postihuje prasata nejčastěji ve věku 5 až 18 týdnů. Mezi uváděnými klinickými příznaky jsou váhový úbytek, horečka, dýchací potíže, zvětšené lymfatické uzliny, v některých případech žloutenka. U postižených prasat dochází k těžké imunodeficienci v důsledku změn prakticky ve všech lymfoidních tkáních tzn. v mizních uzlinách, tonzilách, thymu, Peyerových placích a slezině. Dochází k depleci lymfocytů v lymfoidních folikulech i parafolikulárních zónách. (Clark et al., 1997, Madec et al., 2000). Dalšími příznaky jsou prasečí dermatitida a nefropatie označované jako PDNS („Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome“) (Allan et al., 2000; C et al., 2000). Morbidita v akutně infikovaných chovech prasat dosahuje 4–30 % a mortalita 70–80 %. Přehled o výskytu PCV2-SD v České republice je uveden v publikaci Ficek et al., 2010.



Obrázek 11: Prase postižené PCV2-SD.

Převzato z <http://www.flockandherd.net.au>.

Hlavním faktorem pro vznik PCV2-SD je přítomnost viru PCV2, není však podmínkou jedinou. Značný význam při rozvoji PCV2-SD hraje aktuální stav imunitního systému zvířete. Ke vzniku PCV2-SD došlo například aplikací cyklosporinu A, který působí imunosupresivně. Tím byla potvrzena role adaptivní imunity v kontrole PCV2 infekce (Meerts et al., 2005a). Vznik nemoci také významně souvisí s koinfekcí s dalšími patogeny. Nejčastějšími koinfikujícími patogeny jsou prasečí respirační virus („Porcine Respiratory Syndrome Virus“, PRRSV), virus prasečí chřipky („Swine Influenza Virus“, SIV), prasečí parvovirus („Porcine Parvovirus“, PPV) a bakterie *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* a *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kixmüller et al., 2008). Dalším virem, který

může působit jako kofaktor vzniku PMWS je TTV („Torque teno virus“) – ssDNA virus patřící do čeledi *Circoviridae* (Ellis et al., 2008).

Nutná přítomnost dalšího infekčního agens byla potvrzena pomocí experimentálních koinfekcí prasat dalšími patogeny, např. PPV (Kennedy et al., 2000), PRRSV (Rovira et al., 2002) a *Mycoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig et al., 2004). Podrobně je patologie PCV2 shrnuta v práci Segalés, 2012.

PCV2 izolované z prasat s rozličnými klinickými projevy vykazují v laboratorních podmínkách rozdíly v kinetice replikace (Meerts et al., 2005b). Fylogenetické studie prováděné v několika zemích seskupily PCV2 do „genotypů/genoskupin“ v pořadí, které může být vztaženo k roku izolace (viz. kapitola Prasečí cirkovirus 2).

2.5.2.1.1 Současné, komerčně dostupné vakcíny

I přes velkou snahu je stále velmi obtížné redukovat míru infekce v chovech prasat. V současné době se jako prevence vzniku PCV2-SD využívají vakcíny, které jsou dostupné na komerčním trhu. Existuje několik vakcín, které prokázaly v klinických studiích schopnost efektivně bránit před infekcí PCV2. Tyto vakcíny jsou založeny na několika principech. Prvním typem vakcíny byla vakcína Circovac (Merial), založená na inaktivovaném viru PCV2. Vakcíny od firmy Pfizer Animal Health Suvaxyn PCV2 One Dose a Foster PCV jsou založené na inaktivovaném a atenuovaném chimérickém viru PCV1-2 (jedná se o vakcíny založené na nepatogenním viru PCV1, kde je gen pro protein Cap nahrazen genem pro Cap z patogenního PCV2). Vakcína Foster navíc obsahuje složku chránící proti infekci patogenem *Mycoplasma hyopneumoniae*. Následující tři subjednotkové vakcíny jsou založeny na proteinu Cap z viru PCV2 produkovaném v bakulovirovém expresním systému. Jedná se o vakcíny Ingelvac CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica), Circumvent (Intervet/Merck), a Porcilis PCV (Schering-Plough/Merck). U vakcíny Porcilis PCV se uvádí, že část proteinu Cap je formě VLPs (Beach a Meng, 2012; Meng, 2013). Všechny zde uvedené vakcíny jsou založeny na kmenu PCV2a.

2.5.3 Pokusy o vývoj nových kandidátních vakcín proti PCV2

I přes existenci komerčních vakcín je stále patrná velká snaha vyvinout další účinné vakcíny založené na jiném, či podobném principu, které by byly levnější. Řada zemí (včetně ČR) může z ekonomických důvodů očkovat komerčními vakcínami pouze plemenné kusy, nikoliv jateční prasata. O snaze vyvinout nové vakcíny svědčí poměrně velká publikační činnost na tomto poli.

2.5.3.1 Identifikace imunogenních protektivních epitopů

Množství publikovaných prací se zabývá hledáním imunogenních epitopů proteinu Cap (Gu et al., 2012; Guo et al., 2011; L. P. Huang et al., 2011, Lekcharoensuk et al., 2004, Mahé et al., 2000; Shang et al., 2009), které by byly vhodné k produkci vakcín. Souhrn oblastí, které jsou výsledkem výše zmíněných studií jsou patrné na obr. 12.



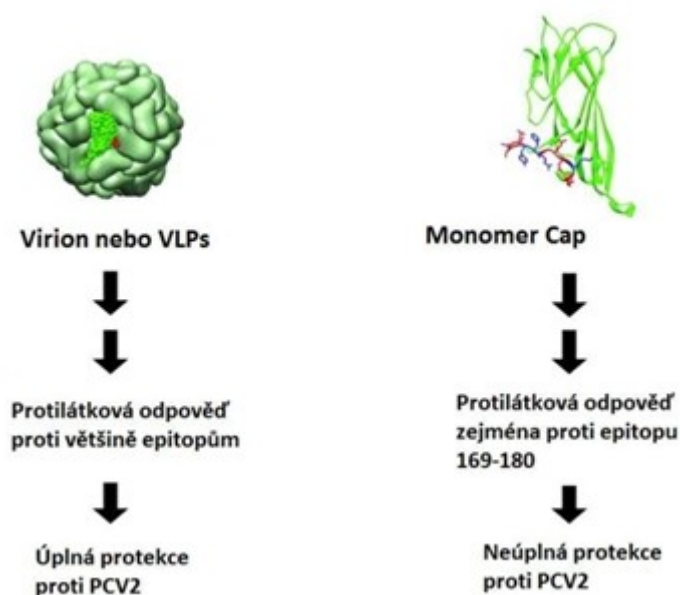
Obrázek 12: Schéma aminokyselinové sekvence PCV2 Cap.

Oblasti, proti kterým je zaměřena nejsilnější protilátková odpověď jsou vyznačeny černě. Převzato z Lekcharoensuk et al., 2004.

V dalších studiích bylo zjištěno, že aminokyseliny na pozicích 59 a 60 proteinu Cap se zřejmě významně podílejí na konformaci důležitého neutralizačního epitopu (J. Liu et al., 2013). Pro konformaci neutralizačních epitopů jsou dále důležité aminokyseliny lokalizované na pozicích 131,151,190 a také poslední tři C-koncové aminokyseliny (Saha et al., 2012; Shang et al., 2009).

Publikovaná krystalografická 3D struktura PCV2 usnadnila vyhodnocování polohy vytipovaných epitopů proteinu Cap v rámci kapsidy a tedy jejich přístupnosti složkám imunitnímu systému (Khayat et al., 2011).

Srovnáním profilu protilátkové odpovědi prasat postižených PCV2-SD s infikovanými prasaty nevykazujícími symptomy onemocnění se zjistilo, že prasata postižená PCV2-SD vytvářela ve velkém množství protilátky zaměřené proti epitopu na pozici 169-180. Tento epitop, který se nachází uvnitř kapsidy slouží patrně jako návnada pro imunitní systém („decoy epitope“). Jedná se patrně o únikovou strategii viru před protilátkovou imunitní odpovědí, neboť intaktní částice jsou pro tyto protilátky neviditelné (obr. 13). To je i možné vysvětlení, proč vakcinace monomerním proteinem je málo účinná (Tribe a Rowland, 2012).



Obrázek 13: Důležitost formy uspořádání proteinu Cap pro účinnost vakcinace.

Převzato a upraveno z Tribble a Rowland, 2012.

2.5.3.2 DNA vakcíny a vakcíny založené na virových vektorech

Pro prevenci infekce prasat virem PCV2 jsou rovněž vyvíjeny DNA vakcíny. Kamstrup et al., 2004 vložili gen kódující protein Cap PCV2 do savčího expresního vektoru. Produkce kapsidového proteinu Cap byla potvrzena jak v tkáňových kulturách, tak *in-vivo*, v myších imunizovaných pomocí genové pistole. V imunizovaných myších byly detekovány protilátky proti proteinu Cap. Jako hlavní výhody DNA vakcinace autor uvádí vysokou čistotu antigenu (plazmid) a jeho snadnou a levnou přípravu. Bohužel, imunitní odpověď myši na DNA vakcínu byla poměrně pomalá, protilátky byly detekovatelné až po třetí imunizaci, po 52 dnech.

Vývojem a testováním mechanismu působení DNA vakcíny na myších se v své práci zabývá také Shen et al., 2008. Autoři získali kandidátní vakcínu, která kromě proteinu Cap produkovala v cílových buňkách i protein Rep, nebo ORF3. Tato ko-imunizace vedla k produkci protilátek proti proteinu Cap a byla schopna vyvolat v myších proliferaci Cap specifických CD8⁺ buněk a produkci specifických neutralizačních protilátek typu IgG2a proti PCV2. Další pokusy zlepšit vlastnosti DNA vakcín spočívaly ve využití koexprese s imunostimulačními molekulami jako IL-15 (Dong et al., 2013), IL-2, nebo ubiquitin a chaperon Hsp70 (Fu et al., 2013a, 2013b).

Protein Cap zkrácený o 41 N-koncových aminokyselin, tedy zbavený NLS a DNA vazebné domény a fúzovaný se signální sekvencí, která směřuje tento protein na sekreční dráhu použili autoři práce (Fan et al., 2008). Tento protein byl produkován expresí z rekombinantního

bakuloviru, který sloužil jako virový vektor. Výsledkem byla poměrně vysoká produkce protilátek, včetně neutralizačních.

Dalším z přístupů byla snaha vyvinout účinnou vakcínu využitím adenovirových vektorů, konkrétně adenoviru typu 5. Tento virus má poměrně velký klonovací prostor a je často využíván v oblasti genové terapie. Rekombinantní adenovirus 5 s deletovanými geny pro proteiny E1 a E3 nesoucí gen pro protein Cap PCV2 použili k produkci vakcíny autoři (Wang et al., 2006). Rekombinantní adenovirus, ze kterého byl syntetizován protein Cap PCV2, byl schopen po imunizaci vyvolat silnou imunitní odpověď u myši i prasat (Wang et al., 2007). Pan et al., 2008 využili adenovirový vektor k produkci chimerických VLPs PPV nesoucích epitopy proteinu Cap PCV2. Wang et al., 2009 zkonstruovali rekombinantní adenovirus typu 5 nesoucí geny dalších dvou virů – gen pro protein Cap viru PCV2 a gen pro obalový protein GP5 viru PRRSV. Adenovirový vektor nesoucí gen pro protein Cap PCV2 a prasečí IFN- γ byl zkonstruován autory Genmei et al., 2011. Specifická imunitní odpověď proti PCV2 u myši byla v tomto případě silnější než při samostatné produkci Cap PCV2 pomocí adenovirového vektoru. Recentním článkem využívajícím adenovirový vektor pro produkci PCV2 vakcíny je práce Li et al., 2016, kde se autoři snaží zvýšit expresi proteinu Cap v buňkách.

K přípravě vakcín proti PCV2 byl použit také herpesvirový vektor připravený z prasečího herpes viru (PRV). Některé geny v genomu PRV nejsou esenciální pro replikaci viru a mohou být nahrazeny geny cizími. Ju et al., 2005 produkovali z PRV vektoru fúzní protein, ORF1-ORF2 PCV2 (Rep-Cap PCV2). Imunitní odpověď byla úspěšně detekována u myši, ne však u imunizovaných prasat. Song et al., 2007 ukázali, že u selat imunizovaných rekombinantním PRV produkujícím protein Cap PCV2 dochází k vyvolání protilátkové a buněčné imunitní odpovědi.

Autoři Gamage et al., 2009; Hayes et al., 2010 vložili epitopy proteinu Cap do trimerizujícího proteinu D, nacházejícího se v hlavičkách bakteriofága Lambda. Ve studii Gamage et al., 2009 byly epitopy proteinu Cap fúzovány s C-koncem D-proteinu. Celkem autoři připravili 4 typy bakteriofágů, každý s jiným epitopem. Testy na prasatech prokázaly indukci specifických buněčných odpovědí.

V práci Lin et al., 2012 se autoři pokoušeli vytvořit vakcínu proti PCV2 na základě rekombinantního prasečího poxviru (SPV). Jako hlavní výhody tohoto systému uvádějí snadnou produkci v zařízeních BSL1 („Biosafety level 1“), lehký průběh infekce divokým typem viru, která přirozeně vymizí a vysokou produkci antigenu rekombinantním virem, který

se množí v cytoplasmě infikovaných buněk. U experimentálně inokulovaných prasat zjistili vysokou produkci neutralizačních protilátek a zmírnění projevu PCV2-SD. V práci Lin et al., 2014 tento koncept autoři ještě vylepšili vložení, kromě genu pro protein Cap, genů pro IL-18 a „M-like“ protein z bakterie *Streptococcus equi*, který je vážným patogenem prasat. Výsledky studie prokázaly signifikantní ochranu prasat proti koinfekci PCV2 a *Streptococcus equi*.

V nedávné době byla publikována práce, kde autoři využívají k vývoji kandidátní vakcíny chimerické VLPs odvozené od „Papaya Ringspot Virus“ (Aguilera et al., 2017). Tyto VLPs nesoucí celkem tři protektivní epitopy z proteinu Cap byly produkovány v bakteriálním expresním systému a byly schopné vyvolat protilátkovou odpověď proti PCV2.

Jako nejjednodušší se při vývoji vakcíny proti PCV2 zdánlivě jeví využití schopnosti proteinu Cap se samouspořádat do VLPs. Řada laboratoří se pokusila produkovat protein Cap v bakteriích s nadějí, že se purifikovaný protein *in-vitro* složí do VLPs. Ukázalo se však, že produkce proteinu Cap v *E. coli* je obtížná. Jedním z důvodů je pravděpodobně přítomnost bazických aminokyselin na N-konci proteinu Cap (MTYPRRRYRRRRHRPR), které jsou součástí NLS (Marcekova et al., 2009; Wu et al., 2008). Autoři se tedy pokusili produkovat Cap zkrácený o bazické aminokyseliny. Navíc provedli optimalizaci kodonů pro expresi v bakteriích. Produkci proteinu Cap v *E. coli* zlepšili, avšak protein se do VLPs nesložil. Ukázalo se, že NLS sekvence hraje důležitou roli v procesu skládání Cap VLPs a má i antigenní funkci (Zhou et al., 2005). Jiní autoři fúzovali Cap z jeho N-konce s jiným proteinovým partnerem, s maltózu vázajícím proteinem (Qiang Liu et al., 2001). To umožnilo zvýšení produkce proteinu Cap, ale znemožnilo tvorbu VLPs. Autoři studie Yin et al., 2010 navázali na N-konec proteinu Cap značku SUMO („Small Ubiquitin-like Modifier“). Po izolaci tohoto fúzního proteinu z *E. coli* odštěpili SUMO pomocí specifické proteázy. Protein se sice skládal *in-vitro* do VLPs, avšak jejich výtěžek byl nízký. Ve studii Bucarey et al., 2009 se autoři pokusili vyvinout orální vakcínu proti PCV2 založenou na extraktu *Saccharomyces cerevisiae* produkujících protein Cap. Při pokusech s originální sekvencí genu Cap neuspěli. Až s uměle syntetizovaným genem s kodonovou optimalizací pro kvasinky získali poměrně vysoké výtěžky proteinu Cap, který se však uspořádával do VLPs neúčinně. Nicméně myši orálně imunizované extraktem těchto kvasinek vykazovaly tvorbu specifických protilátek proti PCV2.

Řada laboratoří se pokusila připravit VLPs PCV2 v hmyzích buňkách s využitím bakulovirového expresního systému, nebo produkcí v larvách *Trichoplusia ni* infikovaných

rekombinantním bakulovirem (Fan et al., 2007; Kekarainen et al., 2010, 2010; Kim et al., 2002; Liu et al., 2008; Misinzo et al., 2005; P. Nawagitgul et al., 2000). Mezi výhody bakulovirového systému oproti bakteriálnímu, patří efektivní produkce proteinů, postranlační modifikace a správná konformace produkovaných proteinů. Z většiny prací vyplývá, že ačkoliv v lyzátech infikovaných hmyzích buněk byly VLPs detekovány, jejich tvorba byla neefektivní a většina proteinu Cap zůstala neuspořádána.

2.6 Bovinní papilomaviry

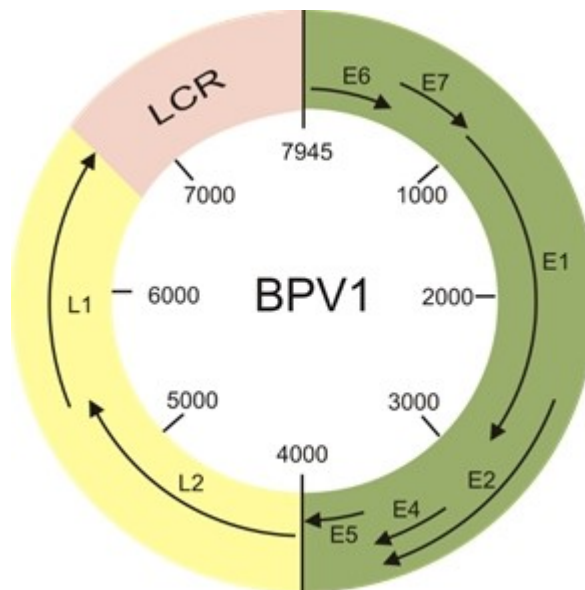
V současné době je s jistotou známo celkem 13 bovinních papilomavirů (BPV-1 – 13), klasifikovaných do celkem třech rodů (Bocaneti et al., 2016):

- Deltapapilomaviry, kam řadíme BPV-1, BPV-2 a BPV-13 způsobují benigní nádory epitelů u skotu (Lunardi et al., 2013b; Rector a Van Ranst, 2013).
- Xipapilomaviry, kam patří BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 a BPV-12 a byly izolovány z papilomů kůže, vemene, struků, jazyka, ústní dutiny a jícnu (Campo, 2002; Tomita et al., 2007).
- Epsilonpapilomaviry zahrnují typy BPV-5 a BPV-8, BPV-5 způsobují fibropapilomy na vemeni a BPV-8 na vemeni a kůži (Rector a Van Ranst, 2013).

BPV-7 byl zařazen do rodu Dyoxipapilomavirus, jako jediný zástupce tohoto rodu a byl identifikován v nádorech struků a kůže (Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007). V práci Munday et al., 2015 objevili autoři v kočičích nádorech asociovaných se skupinou Deltapapilomavirů papilomavirus, pro který navrhuji označení BPV-14.

2.6.1 Organizace genomu a stavba virionu

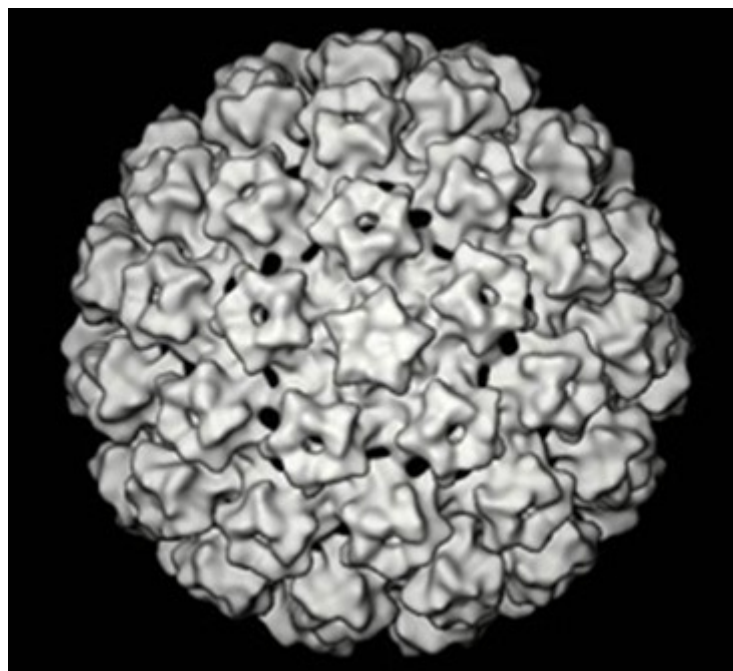
I když jsou papilomaviry druhově a tkáňově specifické, je organizace jejich genomu založená na stejném principu. Genom papilomavirů tvořený dvouvláknovou DNA je dlouhý přibližně 7-8 kbp. Genom můžeme rozdělit z hlediska životního cyklu do třech oblastí na časnou, pozdní a nekódující regulační oblast (obr. 14). Časná oblast genomu obsahuje až 8 ORF označovaných jako E1-E8. Pozdní oblast genomu obsahuje dvě ORF kódující strukturní proteiny kapsidy, L1 a L2. Regulační oblast genomu (LCR) obsahuje počátek replikace a další regulační sekvence. Všechny ORF se nachází na jednom vlákně virové DNA.



Obrázek 14: Organizace genomu BPV1.

Časná oblast genomu – zeleně, pozdní oblast genomu – žlutě, regulační oblast genomu – růžová,
Převzato z Lunardi et al., 2013a.

Kapsida papilomavirů (obr. 15) má ikosaedrální symetrii o průměru 55-60 nm a je složena ze strukturních proteinů L1 a L2. Hlavní kapsidový protein L1 je uspořádán do 72 pentamerů (Baker et al., 1991).



Obrázek 15: Kapsida BPV-1.

Převzato z Trus et al., 1997.

Protein L1 je schopen se samovolně skládat do VLPs (Kirnbauer et al., 1992). Kapsida je stabilizovaná cysteinovými můstky mezi C-konci proteinů L1 (Wolf et al., 2010). Vedlejší

kapsidový protein L2 není nutný pro tvorbu VLPs. V kapsidě je zanořen do dutiny pentameru L1 svým C-koncem, který je hydrofobní povahy (Finnen et al., 2003). N-koncová část proteinu L2 je vystavena na povrchu kapsidy (Liu et al., 1997). Virová kapsida při kontaktu s bazální membránou epitelu prochází konformační změnou, která vede k ještě většímu obnažení N-konce proteinu L2. Tento proces a procesy navazující (např. štěpení proteázou furinem) jsou nutné ke vstupu virionu papilomaviru do buňky. Důsledkem tohoto procesu je i přítomnost protilátek proti N-konci proteinu L2 v krevních sérech (Richards et al., 2006). Kapsidový protein L2 se uplatňuje i v dalších procesech, jako je únik z endozomu (Kämper et al., 2006) a doprava viru do jádra pomocí interakcí s dyneinem (Schneider et al., 2011). Přesný mechanismus a role L2 proteinu při vstupu viru do jádra stále ještě není přesně objasněn. V literatuře se diskutují i další možnosti, jako je vstup do jádra pomocí L2 a jaderné domény 10 (ND-10) (Day et al., 2004), nebo vstup pomocí jaderných pórů umožněných interakcí NLS L2 s buněčnými karyoferiny (Darshan et al., 2004). V práci Pyeon et al., 2009 autoři diskutují cestu vstupu virového genomu do jádra buněk v průběhu mitózy.

Hlavními antigenními determinanty pro imunitní systém, jsou strukturní proteiny L1 a L2, které jsou i hlavním cílem při konstrukci vakcín. V současné době jsou registrované vakcíny pouze proti lidským papilomavírům založených na hlavních kapsidovém proteinu L1, viz. kapitola Využití VLPs vakcín v humánní medicíně.

2.6.2 Bovinní papilomavirus typu 1, BPV1

BPV-1 je nejlépe prozkoumaným a prvním zcela osekvenovaným papilomavírem, který sloužil jako model při studiu transformačních účinků i u lidských papilomavírů (Chen et al., 1982). BPV-1 způsobuje u hovězího skotu a koní kožní fibropapilomy, papilomatózou penisu, struků a vemene typických vějířkovitých tvarů, které jsou odlišné od tvarů způsobených jinými typy boviních papilomavírů (Campo, 2002).

I přesto, že výskyt papilomatóz u hovězího skotu a koní má stále se zvyšující ekonomický dopad zejména s rozvojem volného chovu na pastvinách, stále není na trhu dostupná registrovaná vakcína. Hlavním důvodem, proč není dostupná klasická vakcína založená na atenuovaném nebo usmrceném viru, je nemožnost pomnožit virus v podmínkách *in-vitro*. Tento nedostatek je často nahrazován výrobou tzv. autovakcín, což jsou homogenizáty připravené z papilomů odebraných z již nakažených zvířat a po úpravě podány jako orální preventivní vakcína zdravím kusům. Výhodou je vysoká specifita těchto vakcín, neboť jsou připraveny z nemocných zvířat pocházejících ze stejného stáda nebo oblasti. Nevýhoda spočívá

zejména v nemožnosti masové výroby z důvodu omezeného množství vstupního materiálu. V odborné literatuře lze nalézt publikace, ve kterých se autoři zaměřují na vývoj vakcín rekombinantní technologií. Fakt, že hlavní antigenní determinanta BPV-1, protein L1 je schopen spontánně tvořit VLPs při produkci v expresních systémech a úspěch registrovaných vakcín proti lidským papilomavirům založených na stejném principu, dávají těmto pokusům jasný směr. V práci Jesus et al., 2012 autoři použili kvasinkový expresní systém k produkci VLPs z L1 proteinu papilomavirů typu BPV-1, BPV-2 a BPV-4. Další možností, jak levně a ve velkém množství produkovat VLPs tvořené proteinem L1 BPV-1 je použití rostlinného expresního systému založeného na rostlině *Nicotiana benthamiana*. Výtěžek v tomto případě činil až 183mg VLPs /kg čerstvých listů. VLPs byly schopné vyvolat silnou a specifickou imunitní odpověď v myších (Love et al., 2012). Zatím poslední pokus připravit VLPs odvozené od L1 BPV-1 je popsán v práci Módolo et al., 2017. K produkci proteinu L1 zde byl použit bakteriální expresní systém. Při produkci v *E. coli* však dochází pouze k produkci kapsomer složených z L1, ze kterých je nutné po vyčištění složit *in-vitro* VLPs.

Při vývoji vakcín proti papilomavirům (lidským i bovinním), se autoři zaměřují i na využití vedlejšího kapsidového proteinu L2. Příkladem může být použití N-konce proteinu L2 při vývoji vakcín proti HPV-16 (Gambhira et al., 2007). L2, na rozdíl od L1, má potenciál aktivovat svými specifickými epitopy T-lymfocyty a skýtá tedy potenciál pro vývoj terapeutické vakcín, jak demonstrovali na BPV-2 ve své publikaci Jarrett et al., 1991. Profylaktickými vakcínami proti bovinním papilomavirům se ve svých pracích zabývají i další autoři. V publikaci (Lima et al., 2014) se autoři zabývají myšlenkou vytvořit profylaktickou DNA vakcínu založenou na kombinaci proteinu L2 a E5 proti BPV-1 a BPV-2. Pro terapeutické účely se například u BPV-4 uvažuje i o využití proteinu E7 (Campo et al., 1993; McGarvie et al., 1995). V případě BPV-1 Ashrafi et al., 2008 zkonstruovali chimérické VLPs založené na proteinu L1 a E7 BPV-1.

Nespornou výhodou proteinu L2 je pak vyvolat imunitní odpověď proti více typům papilomavirů – křížová imunitní reakce, jak ve své práci na příkladech bovinních papilomavirů popsali Jagu et al., 2011; Pastrana et al., 2005.

3. Cíle práce:

1. Vyvinout veterinární vakcíny proti prasečímu cirkoviru 2 a bovinnímu papilomaviru 1

- Zkonstruovat univerzálních vektory pro produkci nanočástic na bázi hlavního kapsidového proteinu VP1 MPyV – i) VLPs nesoucích na svém povrchu, nebo uvnitř sekvence cizích proteinů nebo jejich částí ii) chimerických pentamer VP1 fúzovaných se sekvencemi cizích proteinů.
- Připravit rekombinantní bakuloviry pro produkci nanostruktur nesoucích různé epitopy, nebo celou sekvenci kapsidového proteinu PCV2.
- Připravit rekombinantní bakuloviry pro produkci VLPs složených z hlavního kapsidového proteinu L1 BPV-1 nebo chimérických pentamer složených z fúzního proteinu VP1 MPyV a imunogenního epitopu vedlejšího kapsidového proteinu L2 BPV-1.
- Charakterizovat purifikované nanostruktury z hlediska stability.
- Otestovat indukci protilátkové a buněčné imunitní odpovědi po imunizaci myší jednotlivými nanostrukturami.
- Ověřit schopnost indukovat produkci protilátek, včetně protilátek neutralizujících virus, po imunizaci cílových zvířat.

2. Vyvinout diagnostickou metodu pro detekci protilátek proti PCV2 v sérech prasat založenou na principu „blocking ELISA“.

3. Prokázat vazbu VP1 MPyV na mikrotubuly a jeho schopnost ovlivnit buněčný cyklus.

4. Identifikovat enkapsidační signál v genomu MPyV řídící enkapsidaci virové DNA.

4. Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmeny

***Escherichia coli* DH10Bac** – [F- mcrA (mrr-hsdRSM-mcrBC) f80lacZDM15 lacX74 deo R recA1 endA1 araD139 (ara, leu)7697 ga/U ga/K – rpsL nupG/bMON14272/pMON7124]

***Escherichia coli* XL-1 Blue** - [recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

4.2 Eukaryotické buněčné linie

WOP – buněčná linie myších fibroblastů 3T3 stabilně exprimující LT MPyV (Dailey a Basilico, 1985)

PK15 – buněčná linie odvozená z prasečích ledvinových epiteliálních buněk (ATCC; CCL-33)

293TT – lidské ledvinové embryonální buňky stabilně exprimující LT SV40 (Buck a Thompson, 2007)

Sf9 – buněčná linie odvozená z vaječníků motýla *Spodoptera frugiperda* (Thermo Fisher Scientific)

4.3 Viry

PCV2b - identifikováno v České republice – vzorek L14181 (Marcekova et al., 2009)

BPV-1 - získáno z kožních papilomů od klinicky nemocných býků v odchovně Benešov u Boskovic.

4.4 Zvířata

Balb/C (Charles River) – albino myši samice – pořízeny ve věku 8 týdnů z chovné stanice Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Praha nebo firmy Velaz, s. r. o., Praha

MeLiM –miniprasata s dědičnými melanomy – pořízeny ve věku 6 týdnů z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., Liběchov

Prasata různých plemen - (České bílé ušlechtilé, Česká landrasa, Duroc, Pietrain) – chovní kanci ve stáří 1-4 let, pocházející ze šlechtitelské stanice ISK Brná

Býci různých plemen – býci ve věku 3-4 měsíce z odchovny plemenných býčků OPB Osík

4.5 Plazmidy

pFastBacI – Transferový vektor určený pro systém Bac-to-Bac. Umožňuje vložení genu proteinu zájmu pod polyhedrinový promotor a následnou expresi v hmyzích buňkách (Thermo Fisher Scientific).

pFastBacDual – Transferový vektor určený pro systém Bac-to-Bac. Umožňuje vložení dvou genů proteinů zájmu pod dvojici promotorů (polyhedrinový promotor a promotor p10) a následnou expresi obou proteinů v hmyzích buňkách (Thermo Fisher Scientific).

pFastBacDual-VP1/tVP3 – univerzální vektor obsahující gen pro VP1 MPyV a N-koncově zkrácenou variantou proteinu VP3 MPyV (tVP3, AK 105-204), (Hrusková et al., 2009).

pMJG – plasmid pMJ1 obsahující kompletní genom MPyV (Krauzewicz et al., 1990).

pET28b-Cap-His – plasmid obsahující gen pro protein Cap PCV2b pro expresi v bakteriích (Marceková et al., 2009).

pSheLL – plasmid obsahující geny L1 a L2 BPV-1 pro expresi pseudovirionů v savčích buňkách (Addgene plasmid # 37319).

pCLucf – plasmid obsahující geny pro Luciferázu a GFP pro expresi v savčích buňkách (Addgene plasmid # 37328).

p#988 – plasmid obsahující geny L1 a L2 HPV-16 pro expresi pseudovirionů v savčích buňkách, poskytnuto Martinem Müllerem (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg).

pwP – plasmid pro expresi proteinu VP1 pod kontrolou eukaryotického promotoru E1a. Kodony genu pro protein VP1 byly optimalizovány pro expresi proteinu v savčích buňkách. Dále plasmid obsahuje sekvence stabilizující RNA a sekvenci proteinu GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40 (Addgene plasmid 22519).

pCont – plasmid odvozený od plasmidu pwP obsahující polylinker místo genu pro protein VP1, poskytnuto RNDr. Lenkou Horníkovou, PhD.

pVP1 – plasmid exprimující VP1 MPyV v savčích buňkách (Horníková et al., 2011)

4.6 Primery

Primery (5'-3')	
VP1a EcoRI	GATGATGAATTCATGGCCCCAAAAGAAAAAGCGGC
VP1a BamHI	GATGATGGATCCTGAGCCGCTACCGGGTTTGTGAACCCATG
VP1b BamHI	GATGATGGATCCGGGTCTGGCTCTGGAATTTCCACTCCAGTG
VP1b KpnI	GCTGCTGGTACCTTAATTTCCAGGAAATACAGTCTTTG
FLAGCap SmaI	CTCGTACCCGGGATGGATTACAAGGACGATGACGACAAGACGTATCCAAGGAGGC
Cap SacI	CTCGTAGAGCTCTGAGGTTAAGTGGGGGGTC
VP1 BglII BamHI	CTCGTAAGATCTGGATCCATGGCCCCAAAAGAAAAAG
VP1 SalI	GAAGTTGTCGACATTTCCAGGAAATACAGTCTTTG
Cap BamHI	GAAGTTGGATCCATGACGTATCCAAGGAGGC
CapHis KpnI	CTCGTAGGTACCTCAGTGGTGGTGGTGGTG
L1 EcoRI	CTTGATGAATTCATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAG
L1 PstI	CTTGATCTGCAGTTATTTTTTTTTTTTTTTTGCAGGCTTACTGG
L2 1188 BamHI	CTTGATGGATCCAGCGCCTACGACCTGTAC
L2 1188His XhoI	CTTGATCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGGATGGAGGCCAGGGAG

Červeně štěpná místa. Syntéza zajištěna firmou KRD.

4.7 Syntetické oligonukleotidy

Fosforylované oligonukleotidy (5'-3')	
VarA1 FW	GATCCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGCGAACCACAGTCAGAACGCCCTCCG
VarA1 Rev	GATCCGGAGGGCGTTCTGACTGTGGTTCGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAG
VarA2 FW	GATCCGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCCCAG
VarA2 Rev	GATCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACG
VarA3 FW	GATCCCTGAGACTACAACTGCTGGAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACCTGCGTTTCG
VarA3 Rev	GATCCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTTCCAGCAGTTTGTAGTCTCAGG
VarA4 (A5) FW	GATCCGGTTCTGGTCTTTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAACCCTGGTTCTGGTTCTG
VarA4 (A5) Rev	GATCCAGAACCAGAACCAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAAAGAACCAGAACCG
VarA6 FW	GATCCACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAACCCTG
VarA6 REV	GATCCAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTTCTCTGAATTGTACATACATGGTG
VarA7 FW	GATCCTCCACTATTGATTACTTCCAACCAACAAAAGAAACCAGCTGG
VarA7 Rev	GATCCAGCTGGTTTCTTTTGGTTTGGTGGAAAGTAATCAATAGTGGAG
VarA8 FW	GATCCGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGCTCAG
VarA8 Rev	GATCCTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACG

Červeně BamHI štěpné místo.

4.8 Protilátky

4.8.1 Primární

α -MPyV VP1 – myší monoklonální protilátka proti proteinu VP1 MPyV (Forstová et al., 1993)

α -MPyV VP1 (Rabbit) – králičí polyklonální protilátka proti VP1 MPyV připravená v naší laboratoři

α -FLAG – myší monoklonální protilátka proti FLAG sekvenci (Sigma)

α -PCV2 Cap – myší monoklonální protilátka proti Cap PCV2 (Median Diagnostics)

α -PCV2 Cap B9 – myší monoklonální protilátka proti Cap PCV2 (Dyntec)

α -PCV2 Cap H9 – myší monoklonální protilátka proti Cap PCV2 (Dyntec)

α -Penta His – myší monoklonální protilátka proti kotvě His (Sigma)

antiHPV antibody [BPV-1/1H8 + CAMVIR] (ab2417) – myší monoklonální protilátka proti L1 BPV-1 (Abcam)

4.8.2 Sekundární

G α M HRP – kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Bio-Rad)

G α M AF488 – kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor488 (Thermo Fisher Scientific)

D α S HRP – oslí protilátka proti prasečím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Santa Cruz Biotechnology)

G α R 5 nm Gold – kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná se zlatými částicemi o průměru 5 nm (BBI)

G α M 10 nm Gold – kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná se zlatými částicemi o průměru 10 nm (BBI)

4.9 Kultivace buněk

Buňky sf9 byly kultivovány při 27 °C v TNM-FH médiu (Sigma) obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra a 5 % Glutamin (Gibco). Jednalo se o adherentní kulturu.

Buňky PK15 byly kultivovány při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂ v Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM; Sigma) obohaceného 5% bovinním sérem (Gibco). Jednalo se o adherentní kulturu.

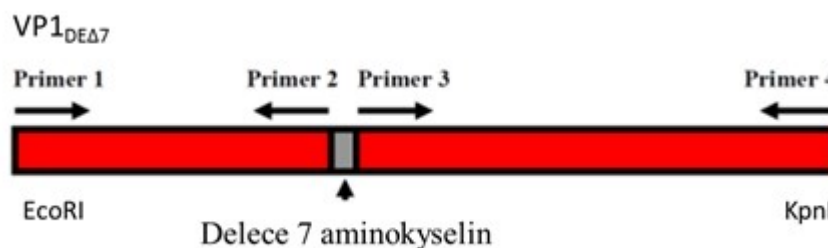
Buňky WOP byly kultivovány při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂ v Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM; Sigma) obohaceného o 10 % bovinního séra (Gibco) a o 2mM glutamax (ThermoFisher scientific). Jednalo se o adherentní kulturu.

4.10 Konstrukce univerzálních vektorů pro inzerci sekvencí genů pro cizorodé proteiny, či peptidy.

4.10.1 VLP-A

Univerzální vektor pro produkci nanostruktur VLP-A (cizorodé epitopy jsou vystaveny na povrchu VP1 VLPs MPyV) je založen na plasmidu pFastBacI (Thermo Fisher Scientific). Nejprve bylo z klonovacího místa („multiple cloning site“, MCS) tohoto plasmidu odstraněno restrikční místo pro restrikční endonukleázu BamHI. Plasmid byl štěpen restrikčním enzymem BamHI (Fermentas) a kohezní konce byly zatupeny pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerázy I (Thermo Fisher Scientific), plasmid byl cirkularizován pomocí T4 DNA ligázy (Thermo Fisher Scientific) a následně linearizován restričními enzymy EcoRI a KpnI.

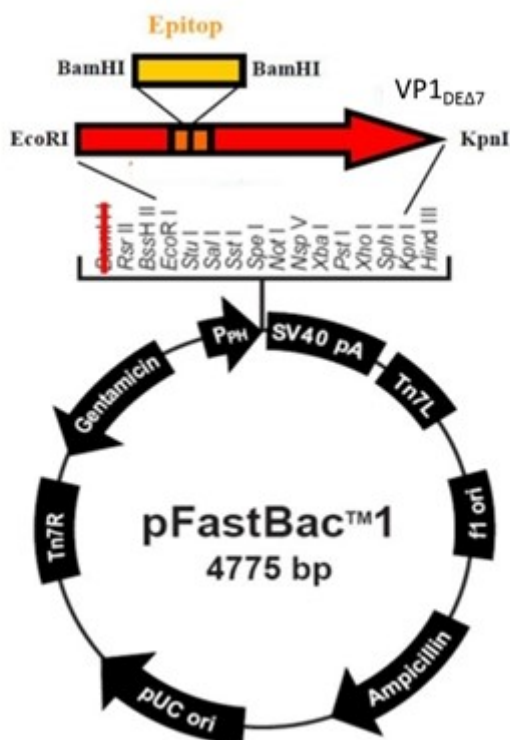
Pomocí PCR byly amplifikovány dvě části genu pro protein VP1 MPyV (VP1a a VP1b), jako zdroj genu pro VP1 MPyV byl použit plasmid pMJG obsahující kompletní genom MPyV. Primery pro amplifikaci byly navrženy tak, aby bylo celkem 7 aminokyselin DE smyčky proteinu VP1 nahrazeno restrikčním místem pro endonukleázu BamHI obklopeným flexibilními glycín-serinovými (G-S)₃ linkery (obr. 16)



Obrázek 16: Schématické znázornění cílené delece 21 nukleotidů (7 AK) v sekvenci genu pro VP1 MPyV pomocí PCR.

Manipulace v rámci DE smyčky nemají efekt na stabilitu proteinu VP1 (Garcia et al., 2000). Na 5' konec genu pro protein VP1 bylo také přidáno pomocí primerů restrikční místo pro endonukleázu EcoRI a na 3' konec pro KpnI. Modifikované fragmenty genu pro protein

VP1 byly spojeny pomocí restrikčního místa BamHI a vloženy do plasmidu pFastBacI přes restrikční místa EcoRI a KpnI. Výsledný konstrukt VLP-A (pFastBacI-VP1_{DEΔ7}) slouží jako univerzální klonovací vektor pro inzerci sekvencí různých cizorodých imunogenních epitopů (přes BamHI místo) do DE smyčky proteinu VP1 (obr. 17).



Obrázek 17: Schématické znázornění několikakrokové přípravy univerzálního vektoru VLP-A v donorovém plasmidu pFastBacI.

Nejprve bylo v polylinkeru MCS deletováno restrikční místo pro BamHI (červená čára). Poté byly přes restrikční místa EcoRI, BamHI a KpnI vloženy obě části proteinu VP1 (VP1a a VP1b), čímž vznikl VP1_{DEΔ7} (červeně) s flexibilním linkerem a BamHI štěpným místem v DE smyčce (oranžově). Do linkeru je možno přes restrikční místo BamHI vkládat sekvence kodující zvolený epitop (žlutě).

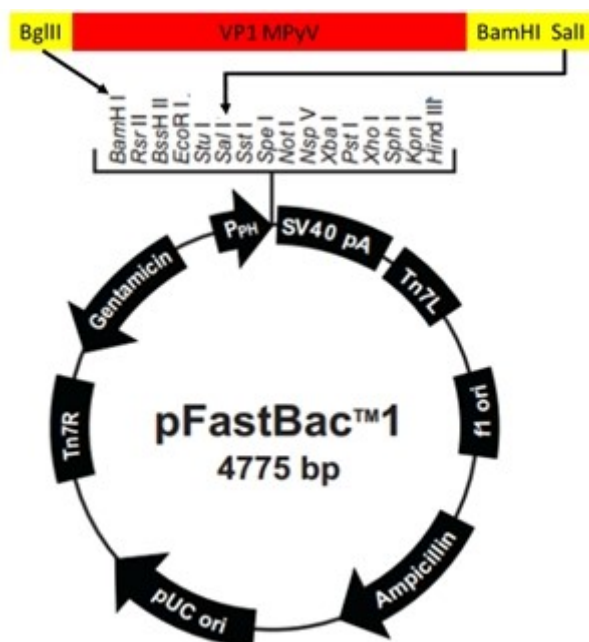
4.10.2 VLP-B

Transferový vektor pro produkci nanostruktur VLP-B (cizorodé epitopy nebo jejich části jsou uzavřeny uvnitř VP1 VLPs) založený na transferovém vektoru pFastBacDual (Thermo Fisher Scientific), který umožňuje expresi dvou genů ze dvou bakulovirových promotorů, byl v minulosti vytvořen v naší laboratoři (Hrusková et al., 2009). Proto jen krátce – gen pro protein VP1 byl vložen do plasmidu pomocí EcoRI a XmaI restrikčních míst pod kontrolu polyhedrinového promotoru. Zkrácená verze genu pro protein VP3 MPyV (tVP3, AK 105-204) byla amplifikována a vložena pod kontrolu bakulovirového p10 promotoru přes SmaI a NheI restrikční místa. Oba geny MPyV byly amplifikovány z plasmidu pMJG. Výsledný konstrukt VLP-B (pFastBacDual-VP1/tVP3) může sloužit jako univerzální klonovací vektor

pro fúzi sekvencí cizorodých proteinů s 3' koncem genu pro protein tVP3. VLPs produkované rekombinantním bakulovirem připraveným pomocí tohoto transferového vektoru obsahují ve svém nitru cizorodý protein propojený přes sekvenci proteinu VP3 s centrálními dutinami pentamerních kapsomer proteinu VP1.

4.10.3 Kapsomera-C

Za účelem konstrukce univerzálního vektoru pro nanostruktury Kapsomera-C byl amplifikován gen pro protein VP1 MPyV z plasmidu pMJG pomocí primerů, které byly navrženy tak, aby byl odstraněn stop kodon a aby bylo na 5' konec genu pro protein VP1 vloženo restrikční místo pro endonukleázu BglII a na 3' konec místa pro BamHI a SalI. Tyto sekvence proteinu VP1 byly poté vloženy do vektoru pFastBacI otevřeného pomocí endonukleáz BamHI a SalI (obr. 18).



Obrázek 18. Schématické znázornění přípravy univerzálního vektoru Kapsomera-C v donorovém plasmidu pFastBacI.

Gen pro VP1 MPyV byl amplifikován s pomocí primerů obsahujících sekvence štěpných míst pro BglII, BamHI a SalI a odstraněným stop kodonem. To umožňuje vložení cizích genových sekvencí za využití zbývajících štěpných míst v polylinkeru.

Sekvence genů pro cizí proteiny, či peptidy mohou být vloženy ve stejném čtecím rámci do několika restrikčních míst (např. BamHI, XbaI, PstI, KpnI nebo HindIII) umožňující jejich fúzi s flexibilním C-koncem VP1. Výsledný konstrukt Kapsomera-C (pFastBacI-VP1_{Δstop}) může sloužit jako univerzální klonovací vektor pro fúzi sekvencí cizorodých proteinů nebo peptidů.

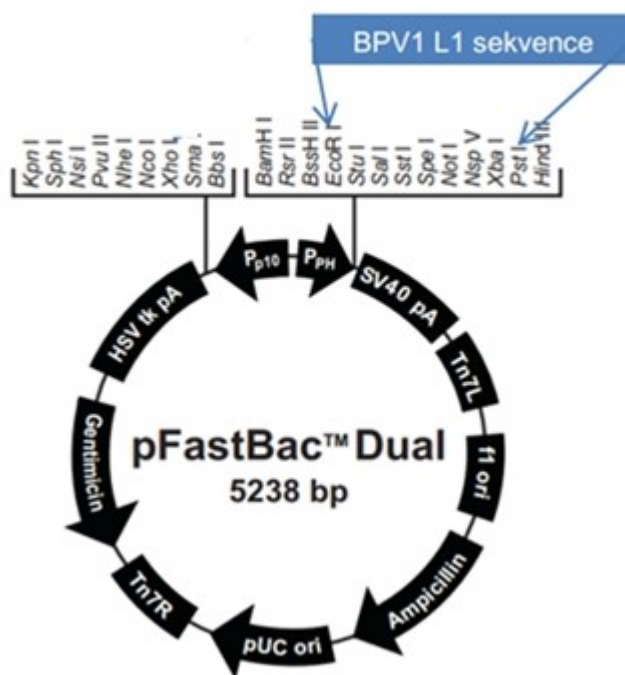
Rekombinantní bakuloviry odvozené od tohoto konstruktu exprimují rekombinantní fúzní protein ve formě obrovských pentamer nebo jejich vyšších struktur.

4.11 Konstrukce bakulovirových transferových vektorů BPV-1

Byly vytvořeny celkem dva konstrukty transferových bakulovirových vektorů. Jeden pro produkci L1 VLPs, druhý založený na univerzálním vektoru Kapsomera–C pro produkci pentamer VP1 MPyV s epitopem prproteinu L2 BPV-1 (aminokyselinová pozice 11–88), tzn. pro produkci pentamer z fúzních proteinů VP1-L2₁₁₈₈-His.

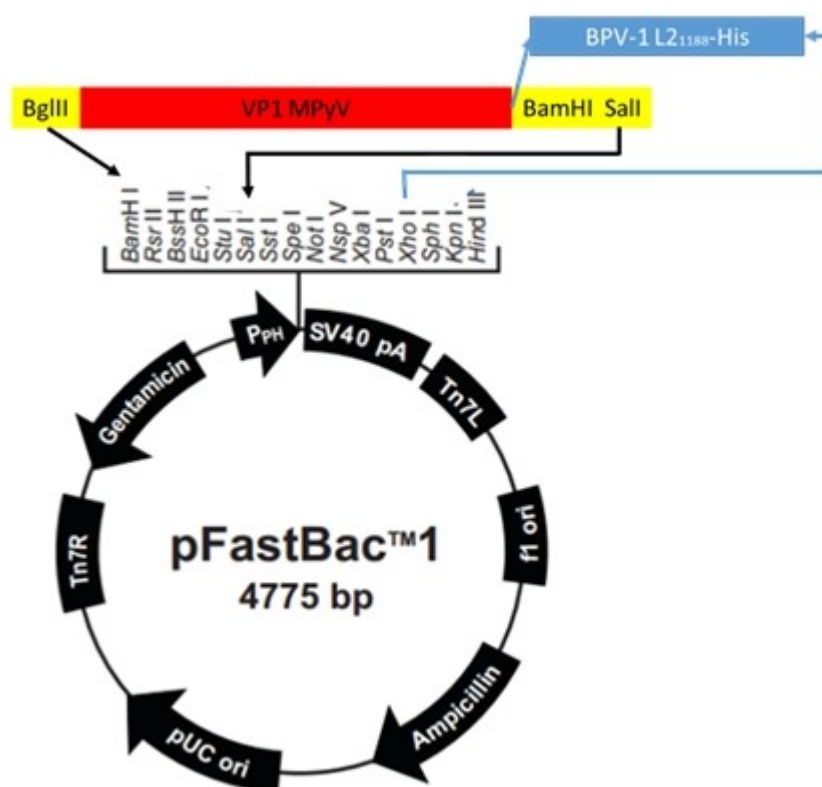
Z tkáňového homogenátu byla izolována celková DNA, která byla použita jako zdroj genů pro kapsidový protein L1. Gen byl amplifikován metodou PCR. Pomocí primerů byly zavedeny na konce genu pro L1 štěpná místa pro restrikční enzymy EcoRI a PstI.

Amplifikovaný gen pro L1 byl po štěpení příslušnými restrikčními enzymy vložen do vektoru pFastBacDual otevřeného příslušnými restrikčními enzymy a defosforylovaného alkalickou fosfatázou (Frementas) (obr. 19)



Obrázek 19: Návrh konstrukce transferového bakulovirového vektoru pro přípravu rekombinantního bakuloviru produkujících protein L1 z polyhedrinového promotoru (pPh).
Gen pro kapsidový protein L1 byl vložen pod polyhedrinový promotor do vektoru pFastBacDual přes štěpná místa restrikčních enzymů EcoRI a PstI.

Pro konstrukci transferového vektoru pro produkci pentamer VP1 MPyV s epitopem prroteinu L2₁₁₈₈ jsme s výhodou využili univerzální vektor Kapsomera-C. Část genu L2 (aminokyselinová pozice 11-88) byla amplifikována, podobně jako geny pro L1 a L2 z celkové DNA izolované z tkáňového homogenátu papilomů postiženého zvířete. Pomocí primerů bylo na 5' konec sekvence L2₁₁₈₈ zavedeno štepné místo pro restriktázu BamHI a na 3'konec sekvence pro His kotvu a štepné místo pro restriktázu XhoI. Amplifikovaná sekvence pro L2₁₁₈₈ byla, po štěpení příslušnými restriktčními enzymy, vložena do univerzálního vektoru Kapsomera-C otevřeného příslušnými restriktčními enzymy a defosforylovaného alkalickou fosfatázou (Fermentas) (obr.20).



Obrázek 20: Návrh konstrukce transferového bakulovirového vektoru pro přípravu rekombinantního bakuloviru produkujícího fúzní protein VP1-L2₁₁₈₈-His.

Gen pro fúzní protein VP1-L2₁₁₈₈-His byl vložen do univerzálního vektoru Kapsomera-C přes štepná místa restriktčních enzymů BamHI a XhoI.

4.1 Inzerce sekvencí kapsidového proteinu PCV2b do univerzálních transferových vektorů

Za účelem přípravy nanostruktur VarA1-A8 byly fosforylované syntetické nukleotidy kódující vybrané epitopy proteinu Cap PCV2 vloženy přes BamHI restriktční místo do univerzálního vektoru VLP-A. Ověřený plazmid byl linearizován restriktčním enzymem BamHI

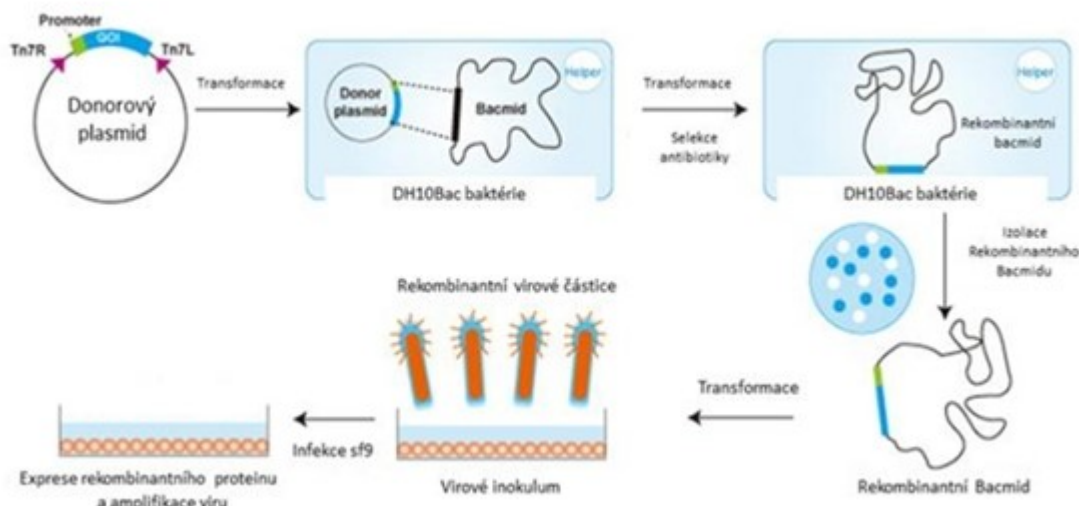
a konce molekuly byly defosforylovány alkalickou fosfatázou (Thermo Fisher Scientific). Příslušné epitopy odvozené od proteinu Cap PCV2 byly připraveny hybridizací syntetických oligonukleotidů. Tyto směsi byly následně elektroporovány do kompetentních bakterií *E. coli* XL1-Blue. Od každé varianty bylo vybráno celkem 10 monoklonií, ze kterých byly metodou „colony“ PCR s následnou agarózovou elektroforézou vytipovány pozitivní monoklonie a jejich sekvenací ověřena přítomnost vloženého epitopu.

Nanostruktura VarB byla připravena tak, že byl celý gen pro protein Cap PCV2b amplifikován pomocí PCR z bakteriálního plasmidu pET28b-Cap-His. Pomocí PCR primerů byla na 5' konec sekvence proteinu Cap vložena sekvence pro FLAG tag. Sekvence FLAG-Cap byla poté fúzována ve stejném čtecím rámci s tVP3 přes restrikční místa SmaI a SacI do univerzálního konstruktu VLP-B a byl získán transferový vektor pFastBacDual-VP1/FLAG-Cap-tVP3.

Pro přípravu nanostruktury VarC byla celá sekvence proteinu Cap PCV2b amplifikována z plasmidu pET28b-Cap-His, který sloužil jako templát. Pomocí PCR primerů bylo na 5' konec Cap genu vloženo restrikční místo pro endonukleázu BamHI a na 3' konec sekvence pro His tag (6 × His) a KpnI restrikční místo. Univerzální plasmid Kapsomera-C byl otevřen restriktázami BamHI a KpnI, defosforylován alkalickou fosfatázou (Fermentas) a výsledný transferový vektor byl označen jako pFastBacI-VP1-Cap-His.

4.2 Příprava rekombinantních bakulovirů

Příprava rekombinantních bakulovirů byla provedena dle manuálu výrobce (Thermo Fisher Scientific). Připravené transferové vektory byly transformovány do bakterií *E. coli* DH10Bac ve kterých došlo k transpozici a vytvoření rekombinantních bakulovirových genomů (bakmid). Několik pozitivních (Lac-) monoklonií obsahující rekombinantní bakulovirový genom bylo zakonzervováno a dále rozpěstováno v LB médiu s antibiotiky, (50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml tetracyclin). Rekombinantní bakmidy byly izolovány pomocí komerční soupravy PureLink™ HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) za účelem purifikace rekombinantní bakulovirové DNA. Takto získané bakulovirové genomomy byly lipofekcí (Cellfectin II reagent, Thermo Fisher Scientific) transfekovány do hmyzích buněk sf9 a rekombinantní bakuloviry uvolněné do média byly 72 hodin po transfekci sklizeny a použity pro další pomnožení infekcí hmyzích buněk za účelem získání virového inokula o vysokém titru. Celý postup je znázorněn graficky na obr. 21.



Obrázek 21: Schéma přípravy rekombinantních bakulovirů z donorového (transferového) plasmidu.
Převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific.

4.3 Purifikace připravených nanostruktur

Buňky sf9 byly infikovány příslušnými rekombinantními bakuloviry o multiplicitě 5 PFU na buňku. Buňky byly sklizeny, podle průběhu infekce, 72 až 94 hodin po infekci. Infikované buňky byly sklizeny seškrábáním a centrifugovány (200 x g, RT, 7 minut). Buněčný sediment byl resuspendován v pufru B a sonikován na ledu po dobu 3 x 30s (sonikátor Soniprep 150, Schoeller Pharmacia Praha). Z takto připraveného nativního lyzátu byly nanostruktury purifikovány ultracentrifugací v gradientu CsCl způsobem popsáným v publikaci Forstová et al., 1993.

4.1 Elektronová mikroskopie

Elektronmikroskopické fotografie byly pořízeny elektronovým mikroskopem JEM-1011 (JEOL), operujícím při napětí 80 kV.

4.1.1 Negativní barvení

Elektronmikroskopické sítě (Cu, 200 mesh, SPI) potažené membránou z Parlodionu (SPI) a vrstvou grafitu byly položeny na 5 µl kapku vzorku v různých ředěních. Absorpce vzorku na Parlodion/grafitovou membránu probíhala po dobu 5 minut. Poté byly sítě opláchnuty dvakrát v kapce filtrované destilované H₂O po dobu 30 sekund a kontrastovány dvakrát minutovou inkubací na kapce 2 % kyseliny fosfowolframové (PTA, pH 7,3, Sigma-Aldrich). Přebytečná PTA byla opatrně odstraněna kouskem filtračního papíru. Poté byly sítě ponechány schnout po dobu 1 minuty.

4.1.2 Imunoelektronová mikroskopie („Flat embedding“)

WOP buňky narostlé na podložních sklíčkách byly transfekovány lipofekcí plasmidem pVP1. Po 24 hodinách byla provedena *in-situ* frakcionace (provedeno RNDr. Lenkou Horníkovou, PhD.). Nerozpustné části, které zbyly po této proceduře na podložních sklíčkách, byly fixovány směsí 3% formaldehydu a 0,01% glutaraldehydu (SPI) v 0,2 M pufru HEPES (Sigma Aldrich) o pH = 7,4 po dobu 30 minut. Následovalo promytí puftrem HEPES, pH = 7,4 s 0,02 M glycine (Serva) po dobu 2 x 10 minut.

Poté bylo přikročeno ke značení proteinů specifickými protilátkami. Vzorky byly blokovány 30 minut v roztoku 1 % normálního kozího séra (NGS, Sigma Aldrich) v 0,2 M pufru HEPES, pH = 7,4. Značení primárními protilátkami probíhalo po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po následném promytí 0,2 M puftrem HEPES, pH = 7,4 (5 x 5 minut) bylo přikročeno ke značení sekundárními protilátkami konjugovanými se zlatými částicemi, které trvalo 30 minut s následným promytím 3 x 10 minut 0,2 M puftrem HEPES, pH = 7,4.

Takto označené vzorky byly dehydratovány v koncentrační řadě roztoku etanolu (30, 50, 70, 96 %, každý 15 minut). Dehydratované buňky byly infiltrovány stoupající koncentrací pryskyřice LR-White (London Resin Company) v ethanolu po dobu 20 minut (100 % etanol: LR White – 2:1; 1:2). Následovalo závěrečné prosycení 100 % pryskyřicí po dobu 1 hodiny, přes noc a 2 hodiny vždy s výměnou pryskyřice za čerstvou. Celý proces dehydratace a infiltrace probíhal při teplotě 4 °C. Po důkladném prosycení bylo přikročeno k polymeraci UV světlem po dobu 48 hodin při teplotě 4 °C.

Vzorky byly nakrájeny na ultratenké řezy (ultramikrotom Leica EM UC7) diamantovým nožem (Diatome) o tloušťce 70 nm. Poté přeneseny na nahé niklové elektronmikroskopické síťky (200 Mesh, SPI), kontrastovány nasyceným roztokem uranyl acetátu (SPI) po dobu 5 minut a extenzivně promyty v demineralizované H₂O.

4.1.3 Ultrastrukturní analýza

Buňky 293TT produkující pseudoviriony byly sklizeny 48 hodin po transfekci, dvakrát promyty předeřhřátým PBS a fixovány 3% glutaraldehydem (SPI) v 0,1 M kakodylátovém pufru, pH = 7,5 (SPI) na ledu po dobu 1 hodiny, s výměnou fixativa po 30 minutách. Fixované buňky byly dvakrát opláchnuty kakodylátovým puftrem, pH = 7,5, seškrábány a postfixovány 1 % oxidem osmičelým po dobu 1 hodiny, 4 °C. Následovalo promytí kakodylátovým puftrem, pH = 7,5 2 x 5 minut. Fixovaná suspenze buněk byla převedena do 3 %, na 42 °C předeřhřáté

nízkotající agarózy, krátce peletována a ponechána ztuhnout na ledu po dobu 15 minut. Pelet obsahující buňky byl nakrájen na kostičky o velikost cca 1 mm.

Následovala dehydratace v etanolové koncentrační řadě (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, 100 %, 100 %, každý 15 minut). Poté byly kousky agarózy obsahující buňky inkubovány v propylenoxidu (Serva) 2 x 10 minut. Takto připravené vzorky byly připraveny na prosycení pryskyřicí AGAR 100 (SPI) ve stoupající koncentrační řadě (AGAR 100 : propylenoxid – 1:2 (15 minut), 1:1 (30 minut), 2:1 (30 minut). Inkubace v koncentrované pryskyřici AGAR 100 trvala při 4 °C přes noc a poté ještě 3 hodiny při laboratorní teplotě. Vzorky byly vloženy do želatinových kapslí číslo 2 (SPI), zality čerstvou pryskyřicí a polymerovány při teplotě 60 °C po dobu 72 hodin.

Vzorky byly nakrájeny na ultratenké řezy (ultramikrotom Leica EM UC7) diamantovým nožem (Diatome) o tloušťce 70 nm. Poté přeneseny na nahé měděné elektronmikroskopické síťky (200 Mesh, SPI), kontrastovány nasyceným roztokem uranyl acetátu (SPI) a Reynoldsovým roztokem (citrát olovnatý, SPI) po dobu 5 minut a extenzivně promyty v demineralizované H₂O.

4.1.4 Imunoelektronová mikroskopie „High-pressure freezing“ a mrazová substitute

Transfekované buňky Wop produkující VP1 MPyV byly vysety do misek s vloženými safírovými sklíčky o průměru 1,4 mm (Leica). Po 24 hodinách byla sklíčka vyjmuta a ponořena do roztoku kryoprotektantu, 20 % bovinního sérového albuminu (BSA, Sigma) v DMEM médiu. Sklíčka s buňkami pokrytá kryoprotektantem byla přemístěna do držáku pro rychlé mražení pod tlakem („High-pressure freezing“) systému Leica EM Pact2 (Leica).

Po rychlém zmražení byly vzorky přeneseny do mrazové substitute (Leica EM ASF2) vybavené automatickým procesorem (Leica EM FSP). Vzorky byly mrazově substituovány acetonem při teplotě -90 °C po dobu 48 hodin. Poté byla teplota postupně zvyšována (5 °C/min) na -50 °C a vzorky byly při této teplotě ponechány 24 hodin. Po mrazové substituci následovala postupná infiltrace pryskyřicí Lowicryl HM20 (EMS) ve směsi s acetonem ve vzrůstající koncentrační řadě (2 h v 25 % HM20, 3 h v 50 % HM20, 3 h v 75 % HM20, 4 h ve 100 % HM20, 8 h ve 100 % HM20). Polymerizace UV světlem začala při teplotě -50 °C po dobu 26 hodin a pokračovala postupným zvyšováním teploty na 20 °C po dobu dalších 14 hodin. Konečné vytvrzení pryskyřice bylo provedeno při teplotě 20 °C po dobu 24 hodin.

Vzorky byly nakrájeny, imunoznačeny a kontrastovány stejným postupem, jak je uvedeno v kapitole Imunoelektronová mikroskopie („Flat embedding“).

4.2 SDS proteinová elektroforéza (SDS-PAGE) a Western blot s následnou imunodetekcí

Purifikované chimérické VLPs a chimérické nanostruktury byly povařeny 5 minut v Laemmliho pufru a rozděleny na 10% (w/V) SDS-polyakrylamidovém gelu (Laemmli, 1970). Separované proteiny byly obarveny Coomassie Brilliant Blue (Serva).

V některých případech byl prováděn Western blot s následnou imunodetekcí proteinů pomocí specifických protilátek. Proteiny byly pomocí elektrotransferu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Serva) ve vychlazeném (4 °C) blotovacím pufru (0,3% (w/V) Tris, 1,44% (w/V) glycin, 20% (V/V) metanol) při napětí 2,5 mA/cm² po dobu 3 hodin. Membrány byly následně blokovány inkubací v 5% (w/V) odtučněném mléce ředěném v PBS po dobu 1 hodiny. Značení membrán primární protilátkou probíhalo 1 hodinu a sekundární protilátkou 40 minut, po každé inkubaci následovalo promývání 3 x 10 minut v PBS. Membrány byly vyvolány pomocí komerčního roztoku Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) a zobrazeny na radiografický film (Agfa).

4.3 Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE)

Pro separaci proteinů byly použity gely a roztoky od firmy Thermo Fisher Scientific dle instrukcí výrobce. Postup metody byl upraven podle Horníková et al., 2011. K purifikovaným nanostrukturám VarC byl přidán NativePage SampleBuffer“ v poměru 4:1 (z výsledného objemu vzorku) a „NativePAGE 5 % G-250 Sample Additive“ v poměru 9:1 (z výsledného objemu vzorku). Vzorky byly inkubovány pět min na ledu a poté separovány v nativním 3-12% (w/V) gradientovém gelu. Separované komplexy byly následně vizualizovány pomocí barvy „SimplyBlue™ SafeStain“ (Thermo Fisher Scientific) dle instrukcí výrobce.

4.4 Hmotnostní spektrometrie

Identifikace a potvrzení přítomnosti imunogenních epitopů Cap PCV2 u nanostruktur VarA1 – VarA5 pomocí hmotnostní spektrometrie byla provedena Mgr. Karlem Harantem z Laboratoře hmotnostní spektrometrie, Biocev, Vestec u Prahy.

4.1 Stanovení akutní virémie u pokusných prasat metodou RT-PCR

Tato metoda byla provedena v akreditované laboratoři RNDr. Ivanem Pšikalem CSc., z firmy Dyntec spol. s r.o. Podrobnější postup lze najít v příložené publikaci.

4.1 Imunizace myší, prasat a skotu

Myši byly rozděleny do skupin o 5 myších a zvířata v každé skupině byla imunizována do podkoží třemi dávkami ve dvoutýdenních odstupech jednou z připravených nanostruktur. Pro imunizaci bylo použito 50 µg proteinu na dávku. Čtrnáct dní po poslední imunizaci byla zvířata uvedena do kompletní anestézie pomocí Halothenu (Sigma-Aldrich), odkrvena a usmrcena.

Prasata byla rozdělena do tří skupin. První skupina prasat byla imunizována nanostrukturami VarC, druhá skupina byla imunizována komerční vakcínou Circoflex (Boehringer-Ingelheim) a kontrolní skupina prasat byla imunizována 30% adjuvans Polygen (MVP Technologies) v PBS. Imunizace byly provedeny dvakrát ve třítydenních odstupech do krčního svalu. Jedna dávka o objemu 1 ml obsahovala 100 µg antigenu a 30% adjuvans Polygen. Imunizace komerční vakcínou Circoflex byla provedena podle instrukcí výrobce. Před imunizací prasat byla kandidátní vakcína VarC inaktivována, kvůli případné přítomnosti rekombinantního bakuloviru binárním ethyleniminem podle Rueda et al., 2000.

Imunizováno bylo celkem 12 kusů býků ve věku třech až čtyřech měsíců rozdělených do dvou skupin. V první skupině bylo 10 zvířat imunizováno kandidátní vakcínou L1 VLPs BPV-1 3x v odstupu 21 dnů. Ve druhé skupině byla dvě zvířata vakcinována 3x „slepou“ vakcínou v odstupu 21 dnů, obsahující pouze adjuvanční látky bez imunogenu. Testovaná kandidátní vakcína byla aplikována do gluteálního svalu v objemu 1 ml (100 µg L1 VLPs BPV-1 v jedné dávce).

4.2 Částečná purifikace a koncentrace viru PCV2

Virus PCV2b byl pomnožen v kultuře buněk PK15. Počáteční inokulum ($TCID_{50} = 10^5$) bylo poskytnuto firmou Dyntec. Buňky byly infikovány multiplicitou infekce (MOI) 0,01 infekčních virových částic na buňku. Šest dní po infekci byly buňky včetně média sklizeny a třikrát zmrazeny a rozmrazeny. Buněčné lyzáty byly centrifugovány při 15000×g a 4 °C po dobu 10 minut a virus byl zakoncentrován ultracentrifugací (25000 rpm, 4 °C, 3 hodiny, rotor SW28, Ultracentrifuga Optima L-90K – Beckman). Sediment byl resuspendován ve vychlazeném pufru PBS a uchován při teplotě -20 °C.

4.3 Stanovení protilátek v krevních sérech metodou ELISA

ELISA destičky (Nunc) byly inkubovány přes noc při 4 °C s 25 µg virové suspenze PCV2 v 50 µl PBS, v případě BPV-1 bylo použito 50 µg virové suspenze získané z přečistěného homogenátu z odebraných papilomů. Po proběhlé inkubaci byly ELISA destičky propláchnuty

pětkrát v PBS obsahujícím 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich) a blokovány po dobu 2 hodin v 2% (w/V) odtučněném mléce v PBS. Poté bylo nanášeno do každé jamky 100 μ l séra kontrolních nebo imunizovaných myší v různých ředěních a destičky byly inkubovány po dobu 1 hodiny. Jako pozitivní kontrola sloužila monoklonální protilátka proti proteinu Cap PCV2, nebo monoklonální protilátka proti L1 BPV-1. Po promytí jamek PBS s 0,05% Tween-20 bylo na 1 hodinu přidáno 50 μ l naředěné sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Jamky byly promyty PBS s 0,05% Tween-20 a převrstveny 100 μ l substrátového roztoku ABTS (Sigma-Aldrich). Absorbance v každé jamce byla změřena při 415 nm pomocí čtecího zařízení Epoch (BioTec Instruments).

Pro detekci tvorby protilátek proti PCV2 imunizovanými prasaty byla použita komerční souprava INgezim CIRCO IgG (Ingenasa) podle instrukcí výrobce.

4.4 Stanovení buněčné imunitní odpovědi *in-vitro*

Tato část pokusů byla zcela provedena RNDr. Magdalenou Krulovou PhD. a Mgr. Michaelou Hájkovou. Metody a materiál použitý při stanovení buněčné imunitní odpovědi *in-vitro* u vybraných nanostruktur VarA4, VarB a VarC lze nalézt v příložené publikaci.

4.5 Nepřímá imunofluorescence

Buňky PK15 narostlé na sklíčkách ve 24jamkové destičce byly fixovány 3% (w/V) formaldehydem po dobu 30 minut. Poté byly permeabilizovány inkubací v 0,1% (V/V) Tritonu X-100 v PBS, opláchnuty 3 x 10 minut v PBS a následně blokovány inkubací v 1 % (w/V) BSA v PBS po dobu 1 hodiny. Buňky byly poté značeny primární protilátkou po dobu 1 hodiny, následně promyty 3 x 10 minut v PBS a inkubovány po dobu 30 minut v sekundární protilátce. Po promytí 3 x 10 minut v PBS byla sklíčka opláchnuta v deionizované H₂O, vysušena a montována do roztoku DAPI Gold Solution (Thermo Fisher Scientific). Preparáty byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem BX-60 (Olympus).

4.6 Sérum neutralizační test (PCV2)

Neutralizační protilátky proti PCV2 byly detekovány pomocí sérum neutralizačního testu upraveného podle Lefebvre et al., 2008 a Meerts et al., 2006. Prasečí ledvinné buňky PK15 byly vysety na podložní sklíčka do jamek 24jamkové destičky v hustotě $1,5 \times 10^5$ /jamku. Séra pocházející od skupin zvířat (prasat, nebo myší) imunizované stejnými nanostrukturami byly smíchána ve stejných objemech a inaktivována při 56 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla směsná séra smíchána v různých poměrech s 1 ml virové suspenze PCV2 ($TCID_{50} = 10^5$) ředěné v DMEM s 5% sérem a tato směs byla inkubována ve 37 °C po dobu 1 hodiny, kvůli účinné

vazbě protilátek na PCV2 viriony. Tyto směsi byly následně použity k infekci buněk PK15 rostoucích na sklíčkách ve 24jamkových destičkách. Po 1 hodině inkubace ve 37 °C byly směsi odebrány, buňky byly opláchnuty bezsérovým médiem a poté inkubovány v DMEM s 5% sérem po dobu 36 hodin, při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Po fixaci byla detekována přítomnost proteinu Cap PCV2 metodou nepřímé imunofluorescence za použití primární protilátky proti proteinu Cap PCV2 a sekundární protilátky konjugované s fluoroforem Alexa Fluor-488. Byl stanoven počet infikovaných buněk ve vzorcích porovnán s počtem infikovaných buněk u kontrol (buňky infikované virem inkubovaným se sérem kontrolních zvířat).

4.7 Sérum neutralizační test (BPV-1)

Test přítomnosti neutralizačních protilátek („neutralization assay“ – NA) se skládá z následujících kroků:

- produkce BPV-1 pseudovirionů pro vlastní testování přítomnosti anti-BPV-1 neutralizačních protilátek a produkce HPV-16 pseudovirionů pro vyloučení zkřížené reaktivity protilátek
- stanovení infekčního titru pseudovirionů pro určení optimálního titru pro NA
- vlastní NA založená na detekci luciferázy

K testování byla použita séra dvanácti býků odebrána před vakcinací a po třetí imunizaci kandidátní vakcínou obsahující L1 VLPs BPV-1 (63. den experimentu). Nejnižší ředění testovaných sér bylo v poměru 1:40, abychom předešli nespecifické neutralizaci způsobené vysokou koncentrací séra.

Test byl proveden dle protokolu z laboratoře Dr. Christophera Bucka uvedeného na <https://home.ccr.cancer.gov/lco/neutralizationassay.htm>, který vychází z odborné publikace stejných autorů (Pastrana et al., 2004). Stručně – k citlivým buňkám (293TT) jsou přidány pseudoviriony preinkubované s testovaným nebo kontrolním sérem v různém ředění a 72 hodin po (pseudo)infekci se hodnotí exprese reportérového genu. Pseudoviriony obsahují dva reportérové geny: gen pro zelený fluorescenční protein (GFP) a gen pro luciferázu. Pro vyhodnocení NA a kvantifikaci množství neutralizačních protilátek bylo využito detekce aktivity luciferázy pomocí komerční soupravy „Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega). Při (pseudo)infekci byly v experimentu použity následující kontroly:

- infekce pseudoviriony v médiu bez testovaného nebokontrolního séra,
- “mock” infekce bez pseudovirionů a séra
- infekce pseudoviriony inkubované s heparinem. Heparin slouží jako pozitivní kontrola, je o něm známo, že interferuje s infekcí (lidskými) papilomaviry.

4.8 Produkce BPV-1 a HPV-16 pseudovirionů

Tato část pokusů byla zcela provedena RNDr. Hanou Španielovou, PhD. Stručně – Buněčná linie 293TT byla kotransfekována plasmidy pSheLL a pCLucf pro produkci L1/L2 BPV-1 pseudovirionů, nebo plasmidem p#988 a pCLucf pro produkci HPV-16 L1/L2 pseudovirionů. Transfekované buňky byly sklizeny 48 hodin po transfekci a izolace a maturace pseudovirionů probíhala podle protokolu uvedeného na <http://home.ccr.cancer.gov/lco/pseudovirusproduction.htm>. Stanovení infekčního titru pseudovirionů bylo stanoveno na základě protokolu uvedeného na <http://home.ccr.cancer.gov/lco/neutralizationassay.htm>.

4.1 Transfekce buněk WOP

Transfekce buněk WOP byla provedena elektroporací přístrojem Nucleofector™ pomocí komerční soupravy Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza) podle pokynů výrobce. Buňky byly vysety 24 hodin před transfekcí a následující den byly sklizeny trypsinizací. K množství 4×10^6 peletovaných buněk bylo přidáno 100 μ l roztoku Nucleofector V a 6 μ g plasmidové DNA (izolované „EndoFree Plasmid Maxi kitem“ (Qiagen), dle manuálu výrobce) a buňky byly elektroporovány za použití program U-030. Buňky byly po transfekci inkubovány v předeřhátém RPMI médiu (Sigma-Aldrich) po dobu 15 minut a následně vysety do kompletního DMEM média (Sigma, 10% fetální bovinní sérum, 2mM glutamax).

4.2 Efekt VP1 MPyV na buněčný cyklus, průtoková cytometrie

Buňky WOP byly elektroporovány plasmidy pwP, pCont, nebo bez přítomnosti plasmidu (kontrola vlivu transfekce) pomocí přístroje AMAXA a vysety na misky v klesající koncentracích tak, aby v následujících osmi dnech po dobu trvání experimentu nedosáhly konfluence (množství buněk na misku o průměru 10 cm: $1,6 \times 10^6$; $1,2 \times 10^6$; $3,2 \times 10^5$; 6×10^5 ; 4×10^5 ; $2,2 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^5$). Od následujícího dne po transfekci (den 1) byly plovoucí i přisedlé buňky každý den sklizeny. Bylo stanoveno množství mrtvých, apoptických a EGFP pozitivních buněk pro každý den experimentu metodou průtokové cytometrie.

Pro analýzu buněčného cyklu bylo použito $1,9 \times 10^6$ buněk, které byly resuspendovány v 0,5 ml DMEM obsahujícího barvivo HOECHST 33342 (Thermo Fisher Scientific) o koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ a inkubovány 40 minut ve tmě při 37 °C, 5% CO₂.

Ke stanovení množství apoptických buněk ve vzorcích byla použita komerční sada Annexin V-Cy3 (BioVision). Celkem 5×10^5 buněk z každého vzorku bylo značeno dle protokolu výrobce.

Mrtvé (nekrotické) buňky byly barveny roztokem DAPI přidaným těsně před měřením na průtokovém cytometru. Finální koncentrace DAPI ve vzorku byla 900 ng/ml.

Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru LSR FORTESSA (BD Biosciences) a data byla vyhodnocena pomocí programu FLOWJO (Treestar). Pro vyhodnocení dat buněčného cyklu byl aplikován model Dean–Jett–Fox, který je součástí zmíněného programu.

4.3 Statistická analýza

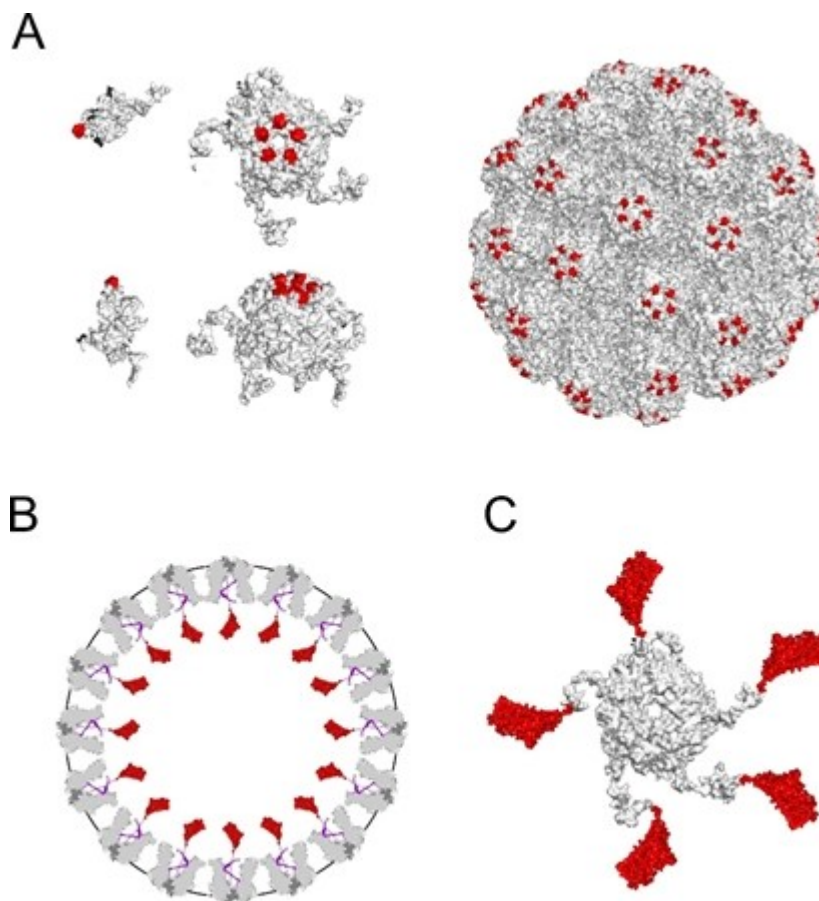
Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD) nebo střední chyba průměru (SEM). Statistická významnost rozdílů mezi průměry jednotlivých skupin byla stanovena použitím analýzy rozptylu (ANOVA). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $P=0,05$.

5. Výsledky

5.1 Vývoj kandidátních vakcín proti PCV2

5.1.1 Návrh a konstrukce univerzálních vektorů pro vývoj vakcín

Na základě struktur odvozených od kapsidových proteinů MPyV byly navrženy celkem tři typy chimerických struktur, VLP-A, VLP-B a Kapsomera-C (obr 22).



Obrázek 22: Návrhy chimérických nanostruktur založených na kapsidových proteinech MPyV.

(A) VLPs MPyV tvořené hlavním kapsidovým proteinem, VP1, který nese na svém povrchu cizí epitopy (VLP-A), **(B)** MPyV VLPs nesoucí cizí peptidy, či celé proteiny uvnitř VLP (VLP-B) **(C)** Kapsomera MPyV složená z pentameru VP1 fúzovaným na svém C-konci s cizím proteinem (Kapsomera-C).

Univerzální vektor pFastBac1 VP1_{DEΔ7}, který slouží k přípravě nanostruktur nesoucích epitopy cizích proteinů vložené v povrchové DE smyčce (VLP-A) byl zkonstruován na základě plasmidu pFastBacI, do kterého byl vložen gen pro VP1 MPyV, zkrácený v oblasti DE smyčky o sedm aminokyselin a s vloženým klonovacím místem obklopeným glycin-serinovými spojovíky. Na konstrukci tohoto vektoru jsem spolupracoval s Mgr. Martinou Kojzarovou.

Univerzální vektor, založený na duálním plasmidu pFastBacDual, určený pro přípravu nanostruktur typu VLP-B byl v naší laboratoři připraven již dříve (Hrusková et al., 2009). Obsahuje gen pro protein VP1 MPyV vložený pod kontrolou polyhedrinového promotoru (pPh)

a gen pro C-koncovou část proteinu VP3 MPyV (tVP3) pod kontrolou promotoru p10, která je zodpovědná za vazbu proteinu VP3 do dutiny kapsomery. Klonovací místo před tVP3 umožňuje fúzi sekvence genu pro cizí peptid, či celý protein. Tento univerzální vektor pFastBacDual VP1/tVP3 tedy umožňuje, po přípravě rekombinantního bakuloviru, expresi proteinu VP1 pro tvorbu VLPs a fúzního proteinu, který je situován uvnitř VLP.

Univerzální vektor pFastBacI VP1_{Δstop} sloužící k přípravě nanostruktur Kapsomera-C je založen na plasmidu pFastBacI, do kterého byl vložen gen pro protein VP1 MPyV s odstraněným stop kodonem a s několika restrikcími místy pro snadnou fúzi s 5'-koncem genu pro cizí protein. Toto uspořádání znemožňuje, po přípravě rekombinantního bakuloviru, tvorbu VLPs, ale tvorba pentamerických kapsomer zůstane zachována. Tento univerzální vektor jsme použili také při vývoji kandidátní vakcíny proti BPV-1.

Podrobná konstrukce viz. kapitola Materiál a metody.

5.1.2 Výběr izolátu a identifikace imunogenních epitopů proteinu Cap PCV2

Kmen PCV2 označený jako Klon5, ze kterého byl získán gen pro Cap protein, byl původně identifikován kvantitativní PCR ve vzorku z inkuinální mízní uzliny (L14181) prasete z českého chovu s klinickými projevy PCV2-SD (Marcekova et al., 2009). Kostra plánovaných rekombinantních vakcín je tvořena hlavním kapsidovým proteinem VP1 myšího polyomaviru (MPyV), který pochází z kmene BG (Velká Británie).

Imunogenní epitopy kapsidového proteinu Cap PCV2, vhodné pro přípravu vakcíny, byly vybrány na základě publikované literatury, viz. kapitola Literární přehled. Nedávno byla publikována 3D struktura proteinu Cap PCV2, která umožnila vyhodnotit polohu vytipovaných epitopů v rámci kapsidy a tedy jejich přístupnost složkám imunitnímu systému.

5.1.3 Příprava a charakterizace nanostruktur odvozených od MPyV nesoucích protein Cap PCV2, nebo jeho imunogenní epitopy

Celkem 7 imunogenních epitopů, nacházejících se na povrchu kapsidy bylo použito pro konstrukci transferových vektorů, založených na univerzálním vektoru VLP-A, pro pozdější produkci kandidátních vakcín typu VarA:

VarA1 (17AK)	S R T F G Y T V K R T T V R T P S TCC CGC ACC TTC GGA TAT ACT GTC AAG CGA ACC ACA GTC AGA ACG CCC TCC
VarA2 (14AK)	V D M M R F N I N D F L P P GTG GAC ATG ATG AGA TTC AAT ATT AAT GAC TTT CTT CCC CCA
VarA3 (18AK)	L R L Q T A G N V D H V G L G T A F CTG AGA CTA CAA ACT GCT GGA AAT GTA GAC CAC GTA GGC CTC GGC ACT GCG TTC
VarA4, VarA5 (10AK)	G S G S F N L K D P P L N P G S G S TTT AAT CTT AAA GAC CCC CCA CTT AAC CCT
VarA6 (18AK)	T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P ACC ATG TAT GTA CAA TTC AGA GAA TTT AAT CTT AAA GAC CCC CCA CTT AAC CCT
VarA7 (14AK)	S T I D Y F Q P N N K R N Q TCC ACT ATT GAT TAC TTC CAA CCA AAC AAA AGA AAC CAG CTG
VarA8 (18AK)	V D M M R F N I N D F L P P G G G S GTG GAC ATG ATG AGA TTC AAT ATT AAT GAC TTT CTT CCC CCA GGA GGG GGC TCA

Poloha epitopů v nukleotidové a aminokyselinové sekvenci Cap PCV2:

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTC
GTCCACCCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTGTCGGGCACTTCGGATATACTGTCAAG
CGAACCACAGTCAGAACGCGCTCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGCTCAAC
CCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCAGGGTGACAGG
GGAGTGGGCTCAAGTGCTGTTATTCTAGATGATACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGACCCCTATGTAACTACTCC
TCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGCTACTTTACCCCAACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTC
CAACCAACAACAAAAGAAACCAGCTGTGGCTGAGACTACAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCCTGCGTTCGAA
AACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGATGTACAATTGAGAGAAATTAATCTTAAAGACCCCCACTTAA
CCTTAA
MTYPRRRYRRRRHRPRSHLQIILRRPWLHPRHRYRWRKNGIFNTRIERTFGYTVKRTTVRTPSWAVDMMRFNINDEFLPPGGGSN
PRSVPFEEYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSYHSRYFTPKPVLDSITIDYF
QPNKNRQLWLRQLTAGNVHDVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNLDPLNPF*

VarA4 a VarA5 obsahují stejný epitop, u varianty VarA5 je pouze zdvojený. Ke zkrácené VarA4(5) byly přidány z obou stran další flexibilní spojníky střídajících se aminokyselin glycin, serin. Oligonukleotidové řetězce, fosforylované na 5' koncích, čištěné elektroforeticky, byly syntetizovány komerčně a vloženy do univerzálního vektoru přes BamHI štěpné místo.

Univerzální vektory VLP-B a Kapsomera-C byly použity pro přípravu dvou transferových vektorů pro produkci kandidátních vakcín. VarB obsahuje celé sekvence proteinu Cap opatřené FLAG tagem na 5' konci genu pro protein Cap pro pozdější snazší ověření produkce imunochemickými metodami. VarC je tvořena fúzním genem VP1-Cap-His (His kotva byla vložena na 3' konec genu pro protein Cap pro snazší ověření produkce imunochemickými metodami a purifikací) uspořádaného do obřích pentamerních struktur.

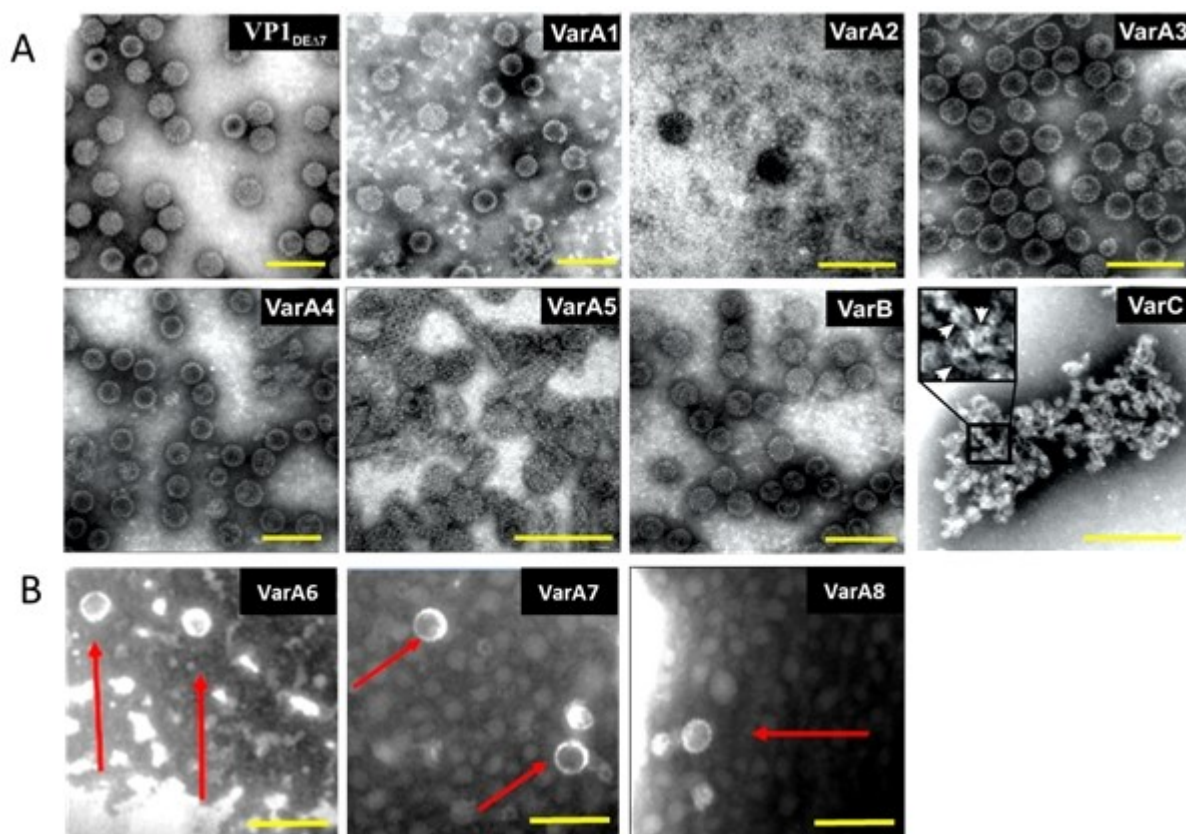
Všechny výše zmíněné transferové vektory byly ověřeny sekvenací a použity pro tvorbu příslušných rekombinantních bakulovirů pro produkci kandidátních vakcín. Lyzáty buněk sf9

infikovaných příslušnými rekombinantními bakuloviry byly použity pro purifikaci a charakterizaci produkovaných chimérických struktur. V případě kandidátních vakcín typu VarA byla použita metoda hmotnostní spektrometrie k ověření přítomnosti vložených epitopů Cap PCV2 v rekombinantních proteinech. Analýza byla provedena servisní laboratoří a Cap epitopy byly přítomné ve všech testovaných variantách.

5.1.3.1 Ověření stability chimérických struktur elektronovou mikroskopií

Elektronmikroskopické snímky ukázaly, že ne všechny navržené struktury vykazovaly potřebnou stabilitu a výtěžek. Nanostruktury VarA1, VarA3 a VarA4 se efektivně a v dostatečném množství skládaly do VLPs, podobně jako VP1_{DEΔ7} (kontrolní VLPs bez vloženého epitopu v povrchové DE smyčce), (obr. 23 A). Exprese nanostruktur VarA2 nevedla k produkci stabilních VLPs. Z elektronmikroskopické fotografie je však patrné, že dochází k tvorbě nepravidelných vysokomolekulárních komplexů složených z rozvolněných pentamerních struktur připomínající tvar VLP. VarA5 se kromě tvorby VLPs z velké části skládá do tubulárních struktur různých průměrů. VarB, nesoucí protein Cap uvnitř částice, tvoří VLPs očekávaného tvaru a velikosti. VarC tvoří proteinové komplexy pravidelných tvarů, které připomínají svou centrální dutinou pentamery VP1 a tvoří velké agregáty.

Produkce nanostruktur VarA6, VarA7 a VarA8 se ukázala být neefektivní (obr. 23 B). Jejich produkce byla doprovázena vznikem malého množství VLPs a z dalších pokusů byly tyto varianty vyřazeny.

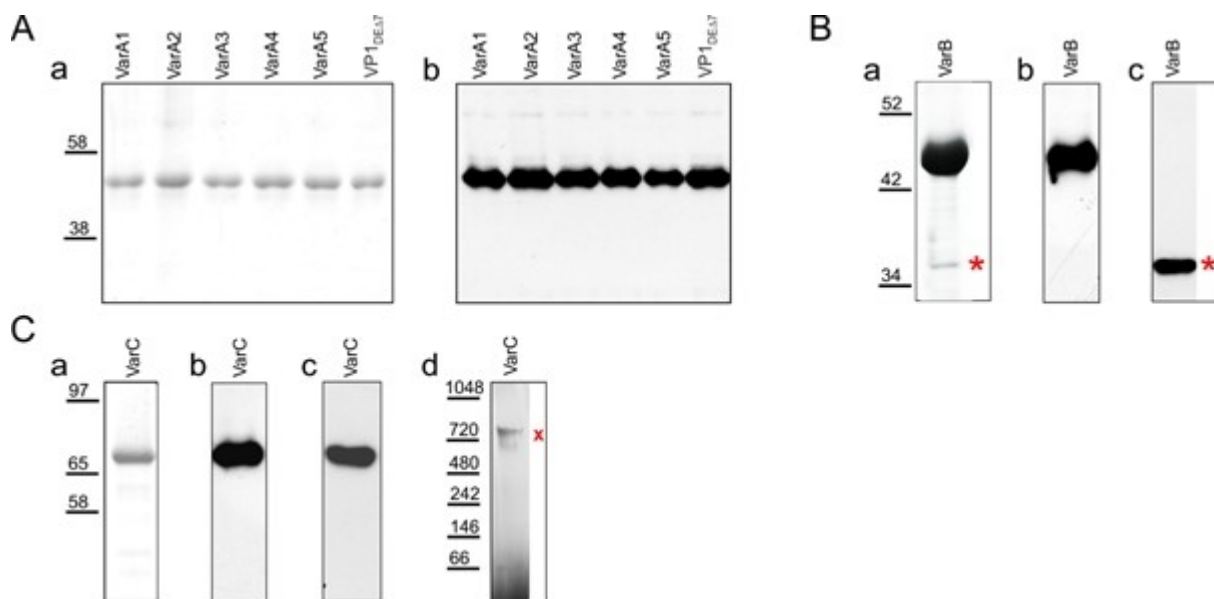


Obrázek 23: Elektronová mikroskopie izolovaných chimerických struktur.

(A) Nanostruktury skládající se dostatečně efektivně do VLPs. **(B)** Nanostruktury s nízkým výtěžkem VLPs. Negativní barvení 2 % PTA. Měřítka – 100 nm.

5.1.3.2 Charakterizace chimérických struktur metodami SDS PAGE a Western blot

Purifikované struktury byly dále charakterizovány denaturující proteinovou elektroforézou (SDS-PAGE), nativní elektroforézou (Blue-Native PAGE, BN-PAGE) a Western blot analýzou (obr. 24).



Obrázek 24: SDS PAGE a Western blot analýza purifikovaných nanostruktur.

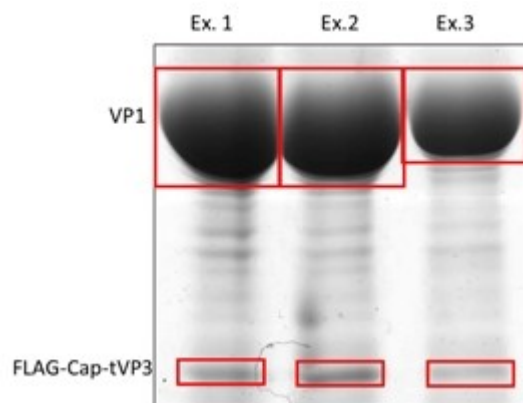
Lyzáty purifikovaných nanostruktur analyzovaných pomocí SDS-PAGE, barveno Coomassie blue (a), Western blot analýza, značeno specifickými protilátkami (b, c), BN-PAGE nativního lyzátu nanostruktury VarC, barveno Coomassie blue (d).

(A) VLP-A (VarA1 – VarA5) a kontrolní VP1_{DEΔ7}. (B) VLP-B (VarB). (C) Kapsomera-C (VarC).

Použité protilátky – proti VP1 MPyV (Ab, Bb, Cb), proti FLAG (Bc) a protilátka proti His tag (Cc).

* Cap-tVP3, x proužek odpovídající dimeru pentameru VarC.

Variety proteinů s vloženým epitopem proteinu Cap v DE smyčce VP1 se na SDS-PAGE s následným Coomassie blue barvením ukázaly jako stabilní, velikostí odpovídaly přibližně proteinu VP1 MPyV (45 kDa) (obr. 24 Aa). Na provedené Western blot analýze s detekcí VP1 MPyV pomocí protilátky nebyly pozorovány žádné degradáty, nebo jen ve velmi malém množství (obr. 24 Ab). Na obrázku 24B je znázorněn výsledek SDS-PAGE (a) a Western blot analýzy (b, c) lyzátu purifikované nanostruktury nesoucí protein Cap PCV2 uvnitř VLPs MPyV. Na SDS-PAGE jsou patrné proužky odpovídající velikostí VP1 a fúznímu proteinu FLAG-Cap-tVP3 (37 kDa), což je potvrzeno Western blot analýzou s následným značením protilátkami proti VP1 MPyV (obr. 24 Bb) a FLAG sekvenci (obr. 24Bc). Teoreticky může jedna VLP obsahovat ve své dutině až 72 molekul fúzního proteinu. Abychom alespoň hrubě odhadli skutečný počet molekul fúzního proteinu na jednu VLP, provedli jsme opakované denzitometrické měření množství proteinu na SDS-PAGE purifikovaných částic barvených Coomassie blue. Výpočtem jsme dospěli k závěru, že jedna VLP obsahuje v průměru cca 12 molekul fúzního proteinu FLAG-Cap-tVP3 (obr. 25).



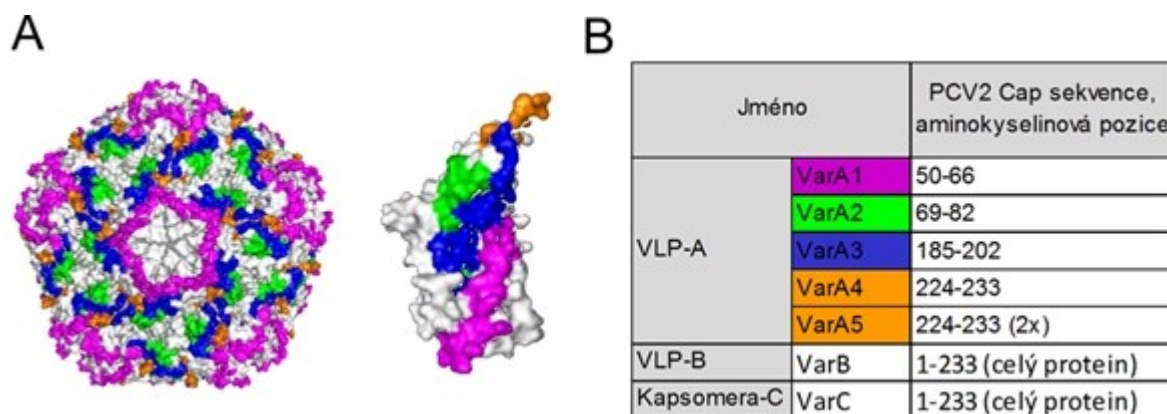
Obrázek 25: SDS PAGE purifikované nanostruktury VarB, denzitometrické měření.

Červené rámečky označují oblasti měření denzit proteinů VP1 a FLAG-Cap-tVP3. Ex.1, Ex. 2 a Ex.3 – měření ze třech nezávislých experimentů a třech nezávislých purifikací.

Na obrázku 24 C je zobrazena analýza nanostruktury VarC, což je fúzní protein VP1-Cap-His. SDS PAGE (obr 24Ca) potvrdila očekávanou velikost tohoto fúzního proteinu (cca 71 kDa). Identifikace fúzního proteinu byla potvrzena analýzou Western blot s následnou detekcí protilátkami proti proteinu VP1 MPyV (obr. 24Cb) a His kotvě (obr. 24 Cc). BN-PAGE pak potvrdila skutečnost pozorovanou na základě elektronmikroskopické analýzy, že VarC tvoří vysokomolekulární komplexy, vyšší, než by odpovídalo teoretické velikosti pentamer tvořených fúzním proteinem, tzn. cca 356 kDa. Proužek detekovaný na gelu BN-PAGE odpovídá velikosti dekameru (2x pentamer). Z intenzity zbarvení tohoto proužku a nahromaděného materiálu na vstupu do gelu, je patrné, že podstatné množství materiálu nebylo schopno do gelu vstoupit.

5.1.4 Charakterizace imunitní odpovědi chimérických nanostruktur v myším modelu

Po předchozím posouzení vlastností nanostruktur metodami elektronové mikroskopie a imunochemickými metodami jsme se rozhodli některé kandidátní nanostruktury vyloučit z dalších pokusů na myších. Nanostruktury, které jsme se rozhodli testovat na myším modelu, jsou přehledně zobrazeny na obrázku 26:



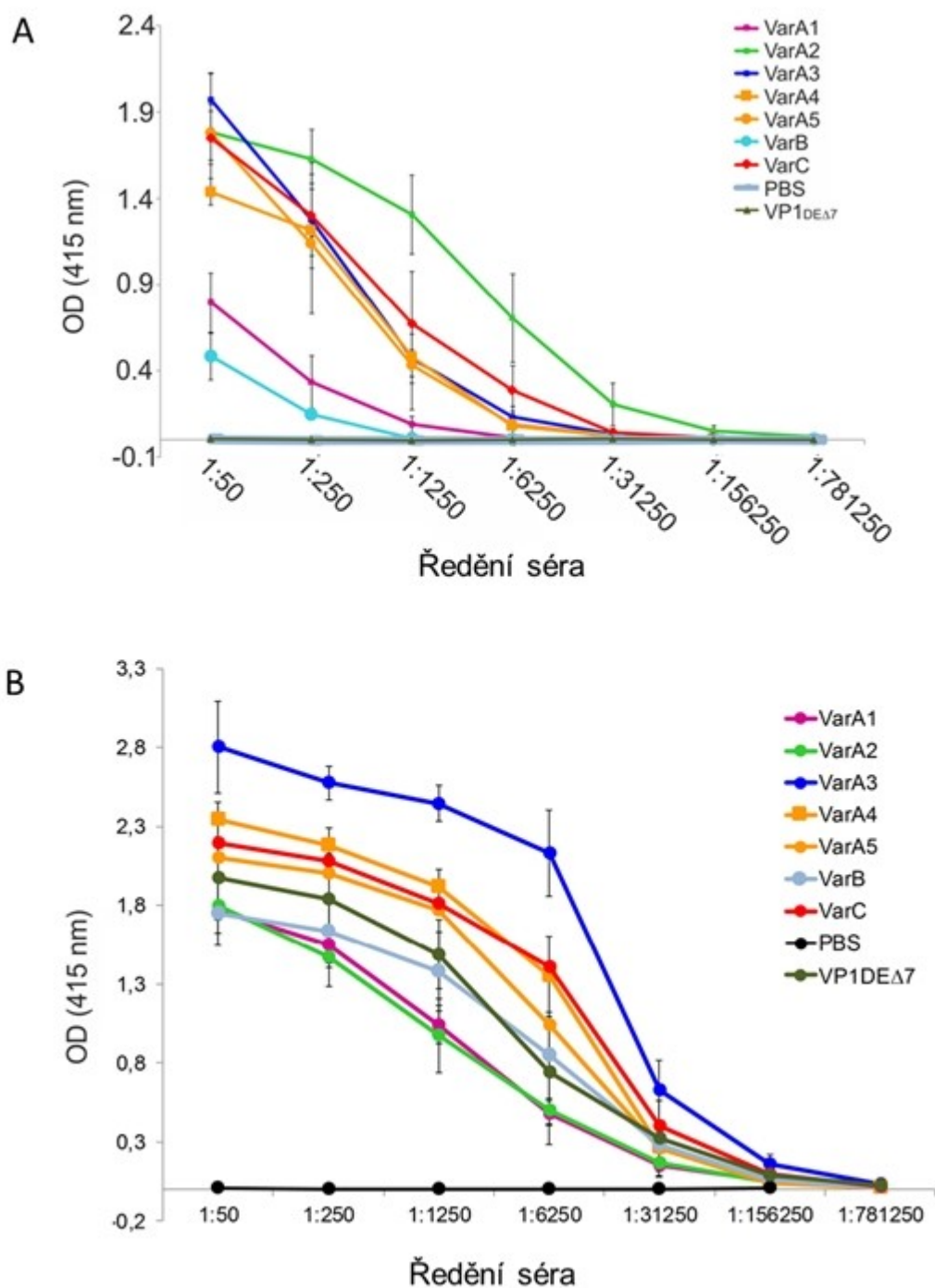
Obrázek 26: 3D model kapsidy PCV2.

(A) Pozice vybraných imunogenních epitopů (barevně) na povrchu PCV2 kapsidy – vlevo a na Cap monomeru – vpravo.

(B) Tabulka sekvencí proteinu Cap vybraných pro produkci nanostruktur, které byly dále testovány na myších.

Vybranými nanostrukturami byly podkožně imunizovány myši Balb/C, viz kapitola Materiál a metody. V každé skupině bylo celkem pět myší. Přítomnost protilátek proti viru PCV2 v krevních sérech myší, odebraných čtrnáct dní po poslední imunizaci, byla testována metodou ELISA ve spolupráci s Mgr. Martinou Kojzarovou. Všechny testované nanostruktury byly schopny vyvolat specifickou protilátkovou odpověď proti PCV2. Nejnížší protilátkovou odpověď proti PCV2, jak jsme předpokládali, vyvolala nanostruktura VarB, s proteinem Cap ukrytým uvnitř VLP (obr. 27 A).

Podle našeho očekávání vyvolaly všechny nanostruktury vysokou protilátkovou odpověď proti proteinu VP1 MPyV, (obr. 27 B)

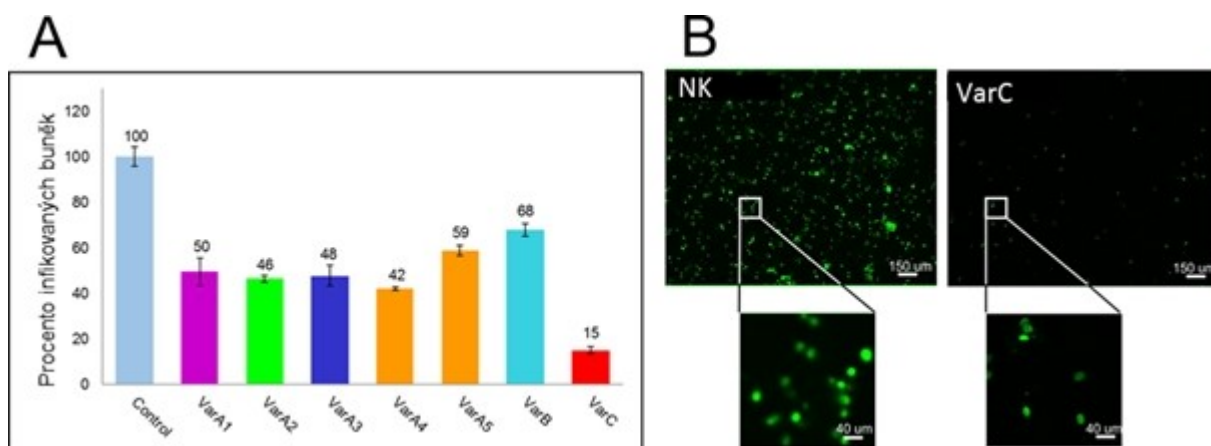


Obrázek 27: Protilátková odpověď proti proteinům Cap PCV2 a VP1 MPyV vyvolaná imunizací myší kandidátními vakcínami.

Skupiny myší Balb/C byly celkem třikrát imunizovány kandidátními vakcínami (50 µg/ dávka). Kontrolní skupiny myší byly imunizovány PBS nebo VLPs odvozenými od VP1_{DEΔ7} ve stejném imunizačním schématu. Přítomnost specifických protilátek v myších sérech proti PCV2 (**A**), nebo proti proteinu VP1 MPyV (**B**) byla stanovena metodou ELISA. Jako cílový antigen byl na ELISA desky navázán koncentrovaný lyzát buněk PK15 infikovaných PCV2, v případě detekce protilátek proti proteinu VP1 MPyV pak purifikované VP1 VLPs MPyV.

Vybraní zástupci od všech typů struktur kandidátních vakcín (VarA4, VarB a VarC) byly také testovány na schopnost indukovat buněčnou složku imunitní odpovědi *in-vitro*. Tyto experimenty byly zcela provedeny spoluautory publikace RNDr. Magdalénou Krulovou PhD., a Mgr. Michaelou Hájkovou. Návrh experimentu a výsledky jsou uvedeny ve společné publikaci, viz. kapitola Přílohy.

Po zjištění, že všechny testované nanostruktury jsou schopné vyvolat protilátkovou odpověď proti PCV2, jsme se zaměřili na testování přítomnosti virus neutralizačních protilátek v krevních sérech myší, což je klíčová vlastnost kandidátních vakcín pro kontrolu virové infekce. Virové inokulum PCV2 bylo smícháno s inaktivovanými séry pocházejícími z myší imunizovaných různými nanostrukturami. Směsi byly inkubovány jednu hodinu při teplotě 37 °C, pro efektivnímu navázání protilátek na částice viru. Takto vytvořené směsi byly použity pro infekci buněk PK15. Infekce probíhala celkem 36 hodin. Poté byly buňky PK15 fixovány, označeny specifickou protilátkou proti proteinu Cap, a Cap pozitivní buňky byly spočítány. Séra pocházející z myší imunizovaných nanostrukturami VarA, vykazovala, při ředění 1:50, přibližně 50 % snížení infekce oproti kontrole infikované směsí viru a kontrolního séra. Vložení zdvojeného epitopu u VarA5 nemělo žádný statisticky významný vliv na množství virus neutralizačních protilátek. Nejlepší výsledek ve schopnosti neutralizovat PCV2 dosáhla nanostruktura VarC. Míra redukce infekce ve srovnání s kontrolou dosáhla cca 85 %, (obr. 28).



Obrázek 28: Neutralizace PCV2 protilátkami obsažených v sérech imunizovaných myší.

Buňky PK15 byl infikovány směsí padesát krát ředěného séra a virového inokula PCV2 (výsledná koncentrace $TCID_{50} = 10^5$). Kontrolní buňky byly infikovány směsí o stejné koncentraci viru a séra, které však pocházelo z myší imunizovaných PBS. Infikované buňky byly detekovány 36 hodin po infekci pomocí imunofluorescence s použitím specifické protilátky proti Cap PCV2. PCV2 pozitivní buňky (zeleně) byl spočítány. Výsledek neutralizace viru je vyjádřen jako procento infikovaných buněk vztahených ke kontrole.

(A) – Sloupcový graf vyjadřující schopnost myších sér neutralizovat PCV2 infekci.

(B) – Reprezentativní fotografie imunofluorescenčně značených kontrolních buněk (NK) a buněk infikovaných směsí viru a séra pocházejících z myší imunizovaných VarC.

Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku tří nezávislých experimentů.

5.1.5 Charakterizace imunologických vlastností nanostruktury VarC po imunizaci prasat

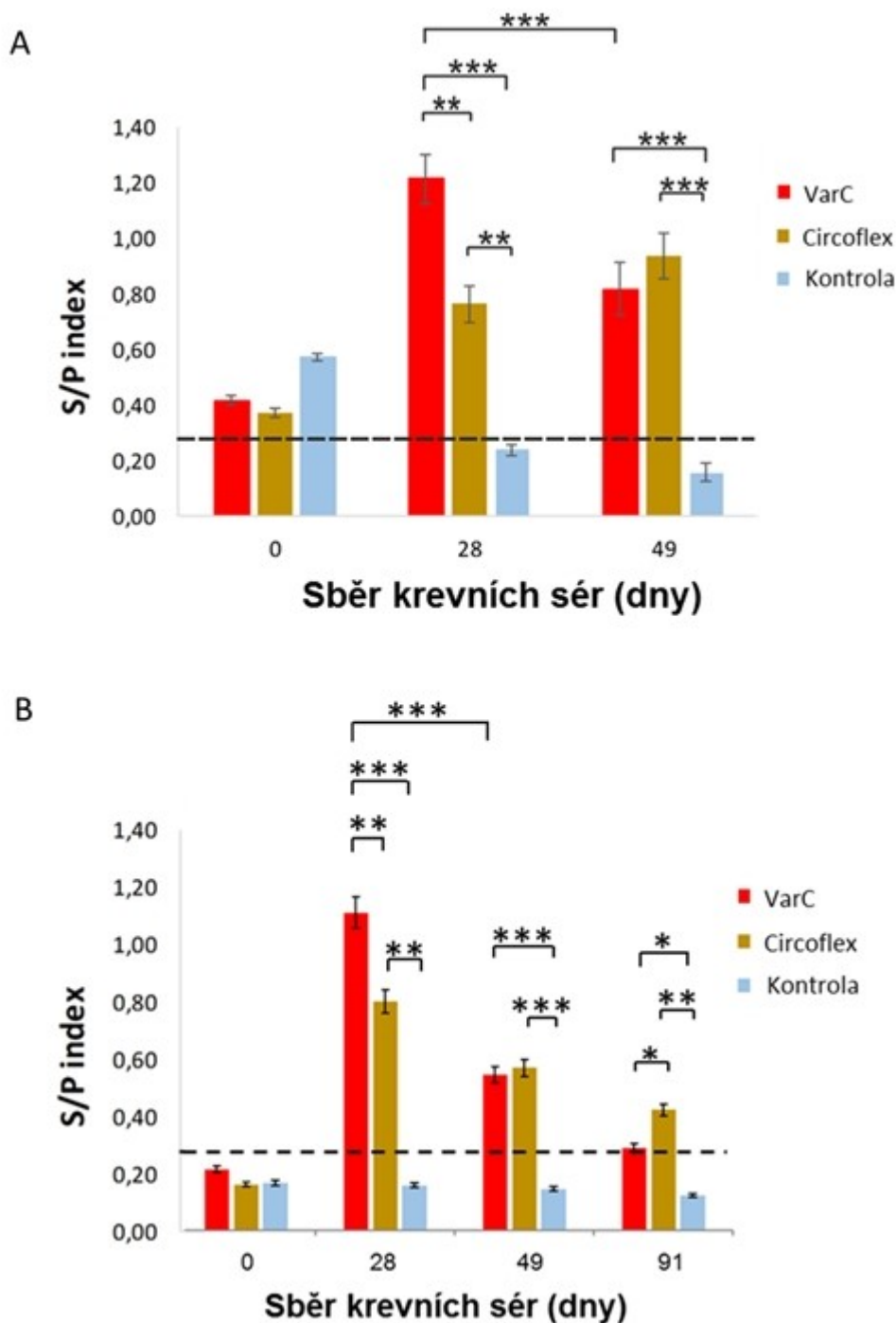
Pro testování imunitní odpovědi v prasatech byla vybrána kandidátní vakcína VarC, která v testech na myších dokázala indukovat nejvíce neutralizačních protilátek proti PCV2 a prokázala schopnost v myších aktivovat i buněčnou složku imunitní odpovědi. Prasata byla před imunizací zkontrolována na přítomnost akutně probíhající PCV2 virové infekce detekcí přítomnosti virové DNA v krevních sérech prasat metodou RT-PCR. Žádné kopie virové DNA nebyly nalezeny. Tento experiment byl proveden laboratoří firmy Dyntec spol. s r.o.

Byly provedeny celkem dva imunizační experimenty podobného formátu. Detailněji je postup imunizace prasat popsána v kapitole Materiál a metody.

V prvním experimentu bylo třináct prasat ve věku šesti týdnů rozděleno do třech skupin. První skupina (sedm kusů) byla imunizována kandidátní vakcínou VarC, druhá skupina (tři kusy) komerční vakcínou Circoflex, která byla použita jako referenční vakcína a třetí skupina (tři kusy) byla imunizována PBS ve směsi s adjuvans Polygen použitého v kandidátní vakcíně VarC. Protilátková odpověď prasat po imunizaci byla měřena komerční soupravou ELISA kit INgezim Circo IgG (Ingenasa). V čase nula (před imunizací) byla naměřena lehce zvýšená hladina specifických protilátek proti PCV2, patrně se jednalo o mateřské protilátky přenesené kojícími prasnicemi. Ve dvacátém osmém dni po první imunizaci byl naměřen signifikantní

nárůst hladin protilátek proti PCV2 u skupin imunizovaných kandidátní vakcínou VarC a komerční vakcínou Circoflex, přičemž hladina protilátek u skupiny VarC byla signifikantně vyšší než u komerční vakcíny. Nicméně čtyřicátý devátý den po imunizaci byl zaznamenán rychlejší pokles hladiny protilátek proti PCV2 indukovaných kandidátní vakcínou VarC a rozdíl mezi oběma vakcínami se stal staticky nevýznamným. Hladina protilátek u kontrolní skupiny v průběhu pokusu klesla pod hladinu positivity séra. Průběh vývoje hladiny protilátek proti PCV2 je přehledně zobrazen na obr. 29 A.

Do druhého experimentu bylo zařazeno celkem 10 kusů prasat z chovu ISK Brná. Celkem čtyři kusy byly imunizovány kandidátní vakcínou VarC, tři kusy byly imunizovány referenční komerční vakcínou Circoflex. Poslední tři kusy byly imunizovány PBS s 30% podílem adjuvans Polygen použitým i v případě kandidátní vakcíny VarC. Trend vývoje hladin protilátek byl prakticky shodný s prvním pokusem. Hladina protilátek proti PCV2 u kusů imunizovaných kandidátní vakcínou VarC a kontrolní vakcínou Circoflex prudce vzrostla ve dvacátém osmém dni po první imunizaci, přičemž hladina protilátek proti PCV2 u kusů imunizovaných kandidátní vakcínou VarC byla opět signifikantně vyšší než v případě Circoflexu. Potvrdil se i trend rychlejšího poklesu hladiny protilátek proti PCV2 v případě kandidátní vakcíny VarC ve srovnání s komerční vakcínou Circoflex. V devadesátém prvním dni po první imunizaci byla hladina protilátek proti PCV2, u skupiny imunizované kandidátní vakcínou VarC, na hranici positivity udávané použitým testem. V čase nula (těsně před imunizací) byla hladina specifických protilátek proti PCV2 pod hranicí považovanou za pozitivní a u kontrolní skupiny se pod touto hladinou udržela po celou dobu experimentu. Průběh vývoje hladiny protilátek proti PCV2 je přehledně zobrazen na obrázku 29 B.



Obrázek 29: Srovnání hladin protilátek proti PCV2 v krevních sérech prasat vyvolaných imunizacemi kandidátní vakcínou VarC a komerční vakcínou Circoflex.

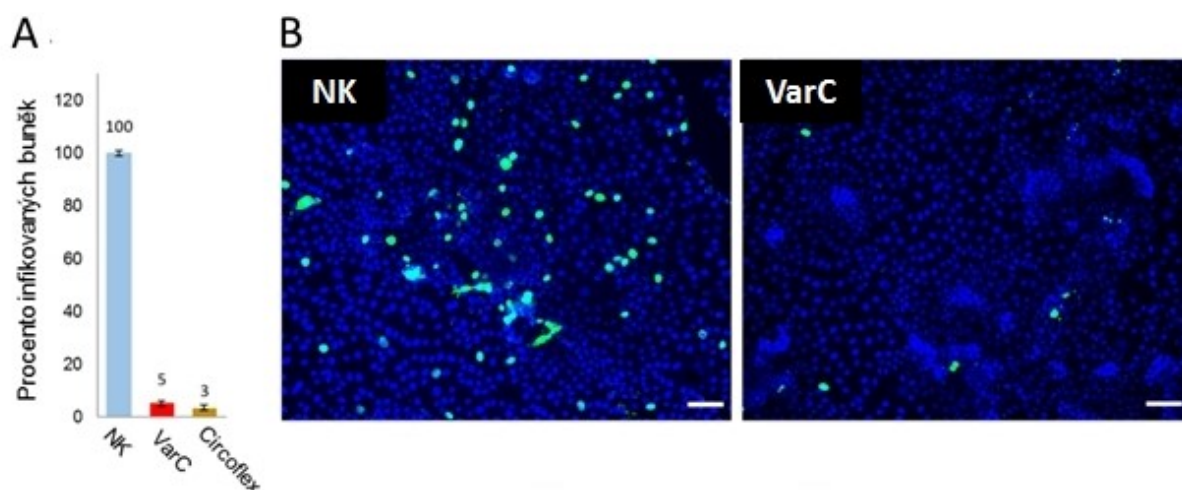
Dvě skupiny prasat byly imunizovány (den 0 a 21) kandidátní vakcínou VarC a komerční vakcínou Circoflex. Kontrolní skupina byla imunizována PBS s 30 % adjuvans Polygen. Hladina protilátek byla měřena komerční soupravou ELISA kit INgezim Circo IgG podle instrukcí výrobce. S/P index vyjadřuje množství protilátek proti PCV2 jako poměr mezi absorbancí testovaných vzorků a absorbance kontrolního vzorku ($OD_{415\text{ nm}}$), který je součástí komerční sady. Přerušovaná linie stanovuje hranici mezi pozitivními a negativními vzorky a je stanovena dle manuálu výrobce.

(A) První experiment (celkem 13 prasat)

(B) Druhý experiment (celkem 10 prasat)

Chybové úsečky představují střední chybu průměru (SEM). * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$.

Stejně jako v případě imunizačních pokusů na myších nás i v případě pokusů na prasatech zajímalo zastoupení virus neutralizačních protilátek v krevních sérech prasat, a tedy schopnost kandidátní vakcíny VarC1 účinně bránit infekci PCV2. Virové inokulum PCV2 bylo smícháno s různými koncentracemi smíchaných inaktivovaných prasečích sér pocházejících z odběru z dvacátého osmého dne po první imunizaci a po jednohodinové inkubaci při 37 °C byla touto směsí provedena infekce buněk PK15. Infekce probíhala celkem 36 hodin. Poté byly buňky PK15 fixovány, značeny specifickou protilátkou proti proteinu Cap, a pozitivní buňky byly spočítány. Výsledky získané z pokusu se stokrát ředěním prasečím sérem jsou znázorněny na obrázku 30. Schopnost kandidátní vakcíny neutralizovat virovou infekci je srovnatelná s komerční vakcínou Circoflex.



Obrázek 30: Neutralizace PCV2 protilátkami obsažených v sérech imunizovaných prasat.

Buňky PK15 byly infikovány směsí stokrát ředěného séra a virového inokula PCV2 (výsledná koncentrace $TCID_{50} = 10^5$). Kontrolní buňky byly infikovány směsí o stejné koncentraci viru a séra, které však pocházelo z gnotobiotického prasete. Infikované buňky byly detekovány 36 hodin po infekci pomocí imunofluorescence s použitím specifické protilátky proti proteinu Cap PCV2. Buňky pozitivní na Cap PCV2 byly spočítány. Výsledek neutralizace viru je vyjádřen jako procento infikovaných buněk vztažených ke kontrole.

(A) – Sloupcový graf vyjadřující schopnost prasečích sér neutralizovat PCV2 infekci.

(B) – Reprezentativní fotografie imunofluorescenčně značených kontrolních buněk (NK) a buněk infikovaných směsí viru a séra pocházejících z myši imunizovaných VarC. DAPI – modře, Cap PCV2 – zeleně.

Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku tří nezávislých experimentů. Měřítka – 50 μ m.

5.2 Stanovení hladiny protilátek proti PCV2 metodou „Blocking“ ELISA

Na této části výsledků jsem spolupracoval s Mgr. Václavem Janovcem. Tento test bylo nutné zavést, protože řada testovaných prasat má již před imunizací různou míru protilátek proti PCV2 a standardní ELISA test by vzhledem k vysoké výchozí hodnotě nebyl dostatečně citlivý. Test, který se nyní používá ve firmě Dyntec ke stanovení hladin PCV2 specifických protilátek a který jsem použil i v této práci – ELISA kit INgezim Circo IgG (Ingenasa) je pro rutinní testování příliš nákladný. Pro zavedení tohoto testu jsme s výhodou využili dvě monoklonální protilátky (B9, H9) cílené proti proteinu Cap produkované hybridomy, které jsou ve vlastnictví firmy Dyntec. Hybridomy byly předány firmě Exbio s.r.o. za účelem purifikace protilátek a jejich konjugace s enzymem křenová peroxidáza. Použití testu založeném na formátu „Blocking“ ELISA není v případě diagnostiky prasat nové (L. Huang et al., 2011), je však nutné ho optimalizovat pro použití s našimi originálními protilátkami a antigeny.

Nejprve bylo nutné zjistit optimální koncentraci cílového antigenu (pentamerní nanostruktury VarC) a druh monoklonální protilátek (B9, H9). Jako nejvýhodnější se ukázalo použití protilátky B9 a koncentrace antigenu 10 µg/ml (data neukázána).

Pilotní test byl proveden s použitím dvou sér pozitivních na specifické protilátky proti PCV2 a dvou negativních prasečích sér (předem testovaných komerčním setem), v ředění 1:100 a 1:1000 (tab. 2).

Číslo vzorku	PCV2/IgG titr ELISA	Ředění sér			
		1:100		1:1000	
		OD _{415 nm}	% inhibice	OD _{415 nm}	% inhibice
DSE 23	3820	0,186	85,4	0,832	34,7
MNR 30	4813	0,4335	65,97	0,9945	21,93
PCG 471	Negativní	1,028	19,3	1,138	10,66
CHD 17	Negativní	1,211	4,95	1,1595	8,99

Tabulka 2: Pilotní test „Blocking“ ELISA na dvou pozitivních a dvou negativních sérech prasat.

Jako 100 % inhibice byla počítána hodnota získaná měřením interakce protilátky B9 s antigenem bez přítomnosti prasečího séra. Tato hodnota byla OD₄₁₅ = 1,274.

Po úspěšném pilotním testu, kde se prokázal rozdíl v inhibici vazby protilátky B9 na navázaný antigen blokováný protilátkami specifickými proti PCV2 obsažených v krevních sérech prasat negativních a pozitivních na protilátky proti PCV2, jsme přistoupili k testování na větším souboru celkem devíti prasečích sér, které pocházely z prasat imunizovaných našimi kandidátními vakcínami VarC, VarA4 a kontrolní komerční vakcínou Circoflex. Výsledky pilotní analýzy shrnuje tabulka 3.

					Den odběru krevních sér po první imunizaci								
					Den 0	Den 28	Den 49	Den 0		Den 28		Den 49	
ředění	Pozitivní sérum kontrolní	Negativní sérum kontrolní	Séra imunizovaných prasat	I.D Prasete	ředění séra 1:100	ředění séra 1:100	ředění séra 1:100	% blokace 1:100	% Průměr	% blokace 1:100	% Průměr	% blokace 1:100	% Průměr
100x	0,159	1,2285	VarC	1	1,059	0,814	0,944	13,80	13,28	33,74	35,23	23,16	26,58
1000x	0,403	1,2185	VarC	2	1,118	0,737	0,905	8,99		40,01		26,33	
			VarC	3	1,019	0,836	0,857	17,05	6,53	31,95	26,69	30,24	8,83
			VarA4	4	1,077	1,027	1,127	12,33		16,40		8,26	
			VarA4	5	1,242	0,963	1,228	-1,10		21,61		0,04	
			VarA4	6	1,126	0,712	1,119	8,34		42,04		8,91	
			Circoflex	7	1,148	0,612	0,667	6,55	3,87	50,18	29,75	45,71	31,19
			Circoflex	8	1,154	1,117	0,96	6,06		9,08		21,86	
			Circoflex	9	1,241	0,86	0,909	-1,02		30,00		26,01	

Tabulka 3: Analýza protilátkové odpovědi testem „Blocking ELISA“ v sérech prasat imunizovaných kandidátními vakcínami VarC, VarA4 a komerční vakcínou Circoflex.

Od každé vakcíny byly testovány 3 séra v ředěních 1:100 a 1:1000. Z naměřených absorbancí ($OD_{415\text{ nm}}$) byly pro výpočet procenta blokace nejvýhodnější hodnoty naměřené při ředění sér v poměru 1:100. Z výsledku vyplývá, že v indukci protilátek je kandidátní vakcína srovnatelná s komerční vakcínou Circoflex. Séra prasat, odebraná 49. den po první imunizaci, imunizovaných kandidátní vakcínou VarA4 zaznamenala výrazný pokles ve schopnosti blokace vazby protilátky B9 na cílový antigen.

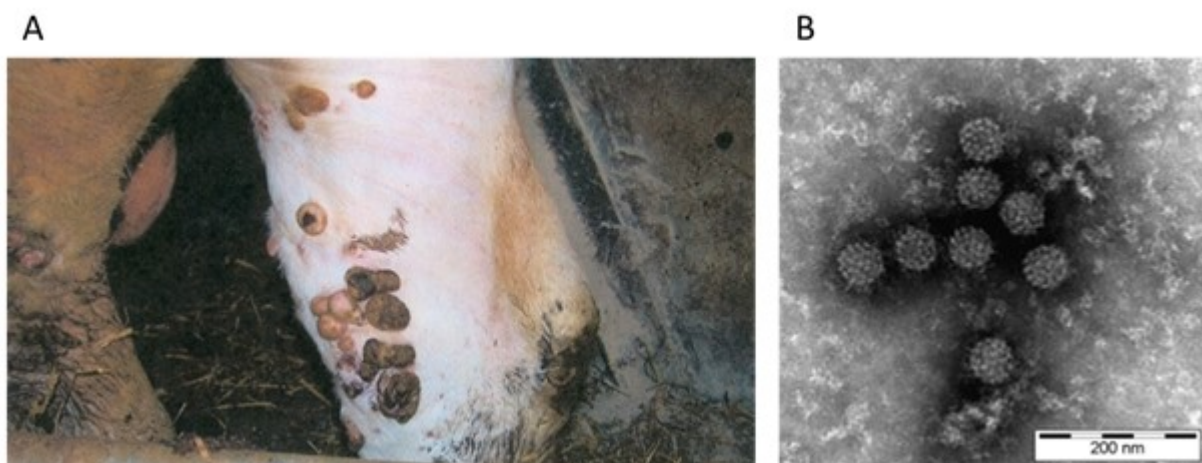
V současné době probíhá validace tohoto testu na velkých souborech prasečích sér ve firmě Dyntec a korelace výsledků s výsledky komerčního testu.

5.3 Vývoj kandidátních vakcín proti BPV-1

K vakcinaci proti bovinnímu papilomaviru lze využít uměle připravené kapsidy VLPs složené buď pouze z hlavního kapsidového proteinu papilomaviru L1, který je sám o sobě schopen se uspořádat do kapsidových struktur nebo z obou kapsidových proteinů, hlavního L1 a vedlejšího proteinu L2, který je částečně exponován na povrchu kapsidy a mohl by přispívat imunogenicitě částic, viz kapitola literárního přehledu Bovinní papilomaviry.

5.3.1 Výběr izolátu a identifikace imunogenních epitopů proteinu BPV-1

V tkáňovém homogenátu, vyrobeném z kožních papilomů od klinicky nemocných býků v odchovně Benešov u Boskovic, byl identifikován metodou PCR genom bovinního papilomaviru, ze kterého byly získány geny pro kapsidové proteiny L1 a L2. Dále byl izolován BPV-1 ultracentrifugací v rovnovážném gradientu CsCl. Izolace BPV-1 byla zkontrolována elektronovou mikroskopií, metodou negativního barvení (obr. 31). Identifikaci typu bovinního papilomaviru provedla a tkáňovou suspenzi dodala firma Dyntec spol. s r.o. Amplifikaci genů pro L1, L2 a purifikaci BPV-1 jsme provedli v naší laboratoři.



Obrázek 31: Izolace a identifikace BPV-1 z českého chovu.

(A) – Kožní papilomy býka v odchovně Benešov u Boskovic, ze kterých byla připravena tkáňová suspenze.

(B) – BPV1 izolovaný ultracentrifugací v rovnovážném gradientu CsCl z tkáňové suspenze.

5.3.2 Příprava a charakterizace nanostruktur

Byly zkonstruován transferový vektor a vyprodukován příslušný rekombinantní bakulovirus pro produkci VLPs v hmyzích buňkách složených z hlavního kapsidového proteinu L1. Později, byl připraven ještě jeden transferový vektor založený na univerzálním vektoru Kapsomera-C (viz. kapitola Návrh a konstrukce univerzálních vektorů pro vývoj vakcín). Tento transferový vektor pVP1-L2₁₁₈₈-His nese fúzní gen složený z VP1 MPyV, imunogenního epitopu proteinu L2 (aminokyselinová pozice 11-88) a His kotvy. His kotva byla vložena na 3' konec sekvence L2 epitopu pro snazší ověření produkce imunochemickými metodami a purifikaci. Také od tohoto transferového vektoru byl vyprodukován rekombinantní bakulovirus, který po infekci hmyzích buněk zajišťuje produkci fúzního proteinu VP1-L2₁₁₈₈-His uspořádaného do pentamerických kapsomer.

Geny, které byly získány amplifikací z DNA purifikovaných virionů byly sekvencovány:

DNA a aminokyselinová sekvence genu pro L1 BPV-1

ATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTATCTCCCTCCAACCCCTGTAAGCAAGGTGCTTTGCAGTGAAACCTATGTGCA
AAGAAAAACATTTTTTATCATGCAGAAACGGAGCGCCTGCTAACTATAGGACATCCATATTACCCAGTGTCTATCGGGGACA
AAACTGTTCTAAGGTCTCTGCAAATCAGTATAGGGTATTTAAAATACAACCTACCTGATCCCAATCAATTTGCACTACCTGAC
AGGACTGTTTCAACAACCAAGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCAGTCATAGGTGTGCAGGTGTCCAGAGGGCAGCCTCTTGGAGG
TACTGTAACCTGGGCACCCCACTTTTAAATGCTTTGCTTGATGCAGAAAATGTGAATAGAAAAGTCACCACCCAAACAGCAGATG
ACAGGAAACAAACAGGCCTAGATGCTAAGCAACAACAGATTCTGTTGCTAGGCTGTACCCCTGCTGAAGGGGAATATTGGACA
ACAGCCCGTCCATGTGTTACTGATCGTCCAAATAATGGCGCCTGCCCTCCTTGAATTAAAAAACAAGCACATAGAAGATGG
GGATATGATGGAAATTGGGTTTGGTGCAGCCAACTTCAAAGAAATTAATGCAAGTAAATCAGATCTACCTCTTGACATTCAAA
ATGAGATCTGCTTGTACCCAGACTACCTCAAATGGCTGAGGACGCTGCTGGTAATAGCATGTTCTTTTTTGAAGGAAAGAA
CAGGTGTATGTTAGACACATCTGGACCAGAGGGGGCTCGGAGAAAGAAGCCCTAGCACAGATTTTTTATTTAAAGAATAATAA
AGGGGATGCCACCCTTAAAATACCCAGTGTGCATTTTGGTAGTCCCAGTGACTCACTAGTCTCAACTGATAATCAAATTTTTTA
ATCGGCCCTACTGGCTATTCCGTGCCAGGGCATGAACAATGGAATTGCATGGAATAATTTACTGTTTTTAAACAGTGGGGGAC
AATACACGTGGTACTAATCTTACCATAAGTGTAGCCTCAGATGGAACCCCACTAAAAGAGTATGATACCTCAAATTTCAATGT
ATACCATAGACATATGGAAGAATATAAGCTAGCCTTTATATTAGAGCTATGCTCTGTGGAATCACAGCTCAAATGTGTAC
ATCTGCAAGGACTTATGCCCTCTGTGCTTCAAATTTGGGAAATAGGTGTGCAACCTCCTACCTCATCGATATTAGAGGACACA
TATCGCTATATAGAGTCTCTGCAACTAAATGTGCAAGCAATGTAATTCCTGCAAAAGAAGACCCTTATGCAGGGTTAAGTT
TTGGAACATAGATCTTAAAGAAAAGCTTTCTTTGGACTTAGATCAATTTCCCTTGGGAAGAAGATTTTTTAGCACAGCAAGGG
CAGGATGTTCAACTGTGAGAAAACGAAGAATTAGCCAAAAAATTCAGTAAGCCTGCAAAAAAATAA

MALWQQGQKLYLPPTPVSKVLCSETYVQRKNIFYHAETERLLTIGHPPYVPSIGDKTVPKVSANQYRVFKIQLPDPNQFALPD
RTVHNPSKERLVWAVIGVQVSRGQPLGGTVTGHPTFNALLDAENVNRKVTTQTADDRKQTLDAKQQQIILLGCTPAEGEYWT
TARPCVTDPRNNGACPPLELKNKHIEDGDMMEIGFGAANFKEINASKSDLPLDIQNEICLYPDYLKMAEDAAGNSMFFFFARKE
QVYVRHIWTRGGSEKEAPSTDFYLNKNGDATALKIPSVHFGSPSDSLVSTDNQIFNRPYWLFRAGQGMNNGIAWNNLLFLTVD
NTRGTNLTISVASDGTPLKEYDTSKFNVYHRHMEYKLAFILELCSVEITAQTVSHLQGLMPSVLQNWIEIGVQPPTSSILED
YRYIESPATKCSNVIPAKEDPYAGFKFWNIDLKEKLSLDLDQFPLGRFLAQQGAGCSTVRKRRIISQKTSKPAKKKKK*

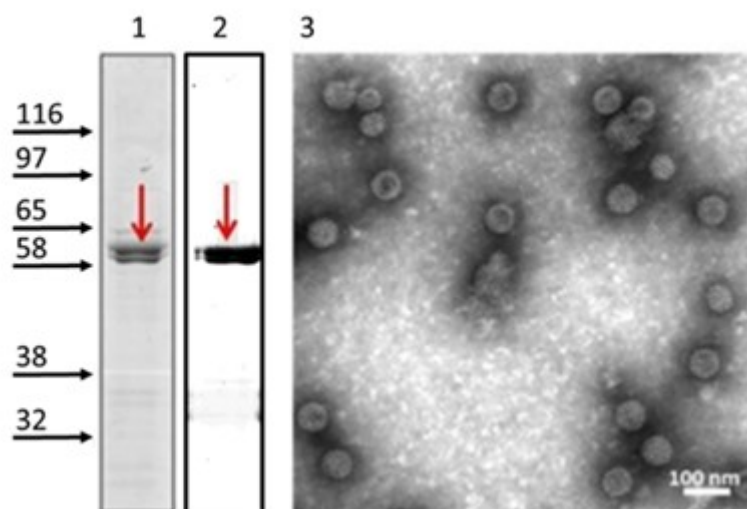
DNA a aminokyselinová sekvence genu pro L2 BPV-1

ATGAGTGCACGAAAAAGAGTAAAACGTGCCAGTGCCTATGACCTGTACAGGACATGCAAGCAAGCGGGCACATGTCCACCAGA
TGTGATACCAAAGGTAGAAAGAGATACTATAGCAGATAAGATTTTGAAATTTGGGGGTCTTGCAATTTACTTAGGAGGGCTAG
GAATAGGAACATGGTCTACTGGAAGGTTGCTGCAGGTGGATCACCAAGGTACACACCACTCCGAACAGCAGGGTCCACATCA
TCGCTTGCATCAATAGGATCCAGAGCTGTAACAGCAGGGACCCGCCCCAGTATAGGTGCGGGCATTCTTTAGACACCCTTGA
AACTCTTGGGGCCTTGCGTCCAGGGGTGTATGAGGACACTGTGCTACCAGAGGCCCTGCAATAGTCACTCCTGATGCTGTTT
CTGCAGATTGAGGGCTTGATGCCCTGTCCATAGGTACAGACTCGTCCACGGAGACCCTCATTACTCTGTTAGAGCCTGAGGGT
CCCGAGGACATAGCGTTCTTGAGCTGCAACCCCTGGACCGTCCAACCTTGGCAAGTAAGCAATGCTGTTTCATCAGTCTCTGC
ATACCACGCCCCCTCTGCAGCTGCAATCGTCCATTGCAGAAACATCTGGTTTAGAAAATATTTTTGTAGGAGGCTCGGGTTTAG
GGGATACAGGAGGAGAAAACATTGAACTGACATACTTCGGGTCCCCACGAACAAGCACGCCCCGAGTATTGCCTCTAAATCA
CGTGGCATTTTAACTGGTTCAGTAAACGGTACTACACACAGGTGCCCACGGAAGATCCTGAAGTGTTTTCATCCCAAACATT
TGCAACCCACTGTATGAAGCAGAACCAGCTGTGCTTAAGGGACCTAGTGGACGTGTTGGACTCAGTCAGGTTTATAAACCTG
ATACACTTACAACACGTAGCGGGACAGAGTGAGGACACAGCTACATGTCAGGTACTCATTGAGTACTATACATGAAGATGTA
GAAGCAATCCCCTACACAGTTGATGAAAATACTCAGGGACTTGCATTGCTACCCCTGCATGAAGAGCAAGCAGGTTTTGAGGA
GATAGAATTAGATGATTTTAGTGAGACACATAGACTGCTACCTCAGAACACCTCTTCTACACCTGTTGGTAGTGAGTACGAA
GAAGCCTCATTCCAACCTCAGGAATTTAGTGCAACACGGCTACAGGTGTTGTAACCTATGGCTCACCAGACACTTACTCTGCT
AGCCCAGTGACTGACCCTGATTCTACCTCTCCTAGTCTAGTTATTGATGACACTACTACTACCAATCATTTATAATTGATGG
GCACACAGTTGATTTGTACAGCAGTAACCTACACCTTGATCCCTCCTTGTGAGGAAACGAAAAAACGGAACATGCCTAA

MSARKVRKRASAYDLRTCKQAGTCPPDVIPKVEGDTIADKILKFGGLAIYLGGLGIGTWSTGKVAAGGSPRYTPLRTAGSTS
SLASIGSRAVTAGTRPSIGAGIPLDTLETGALRPGVYEDTVLPEAPAIVTPDAVPADSGLDALSIGTDSSTETLITLLEPEG
PEDIAVLELQPLDRPTWQVSNVHQSSAYHAPLQLQSSIAETSGLENIFVGGSGLGDTGGENIELTYFGSPRTSTPRSIASKS
RGILNWFSKRYTQVPTDEPVFSSQTFANPLYEAEPVLKGPSSRVGLSQVYKPDLTLTTRSGTEVGPQLHVRYSLSITHEDV
EAIPTVDENTQGLAFVPLHEEQAGFEEIELDDFSETHRLLPQNTSSTPVGSGVRRSLIPTQEFSATRPTGVVITYGSPDTYSA
SPVTDPDSTSPSLVIDDTTTPIIIDGHTVDLYSSNYTLHPSLLRKRKRKHA*

5.3.2.1 *Ověření stability chimérických struktur elektronovou mikroskopií, metodami SDS-PAGE a Western blot*

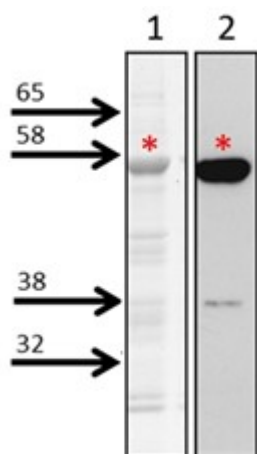
Elektronmikroskopické snímky, SDS-PAGE a Western blot s následnou imunodetekcí proteinu L1 (obr. 32) ukázaly, že nanostruktura L1 VLP BPV-1 se v hmyzích buňkách skládá do VLPs morfologicky podobným BPV-1 virionům a vykazuje potřebnou stabilitu a výtěžek.



Obrázek 32: SDS-PAGE, Western blot a elektronmikroskopická analýza purifikovaných VLPs odvozených od L1 VLPs BPV-1.

1) SDS PAGE, barveno Coomassie blue, **2)** Western blot s imunodetekcí proteinu L1 (červená šipka), **3)** elektronmikroskopický snímek L1 VLPs BPV-1, negativní barvení.

Co se týká konstruktů založeného na univerzálním vektoru Kapsomera-C, který nese imunogenní epitop L2₁₁₈₈ opatřený His kotvou a fúzovaný s genem pro protein VP1 MPyV byl, v čase sepsání této práce, úspěšně dokončen transferový vektor pVP1-L2₁₁₈₈-His, produkce virového inokula obsahující příslušný rekombinantní bakulovirus, proces purifikace pentamerních struktur, analýza pomocí SDS-PAGE a Western blot analýza s následnou imunodetekcí fúzního proteinu VP1-L2₁₁₈₈-His protilátkou proti His kotvě (obr. 33)



Obrázek 33: SDS-PAGE a Western blot analýza lyzátu purifikovaných pentamer VP1-L2₁₁₈₈-His.

1) SDS PAGE barveno Coomassie blue.

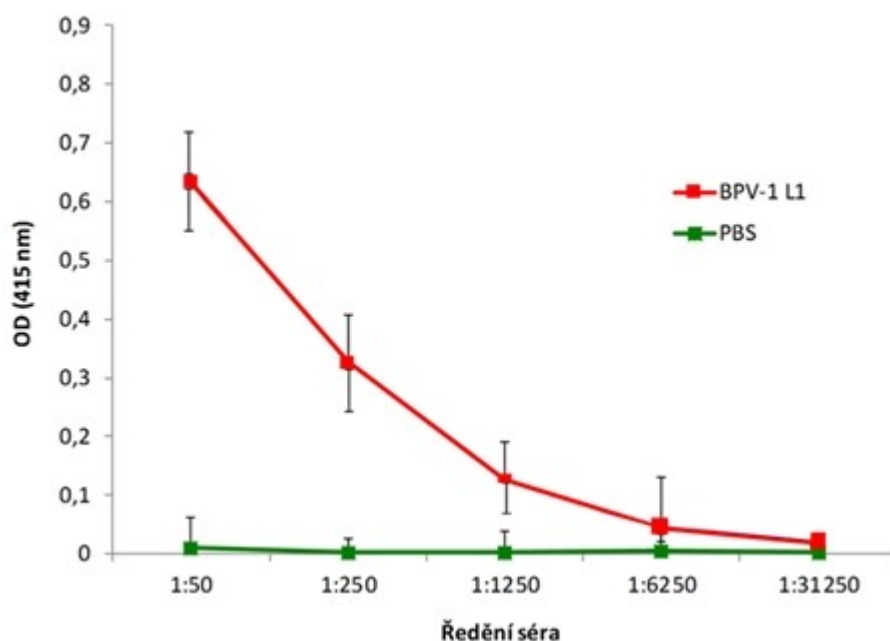
2) Western blot s imunodetekcí VP1-L2₁₁₈₈-His protilátkou proti His kotvě.

* fúzní protein VP1-L21188-His.

5.3.3 Imunologická analýza

5.3.3.1 Stanovení protilátek v krevních sérech myší po imunizaci VLPs BPV1

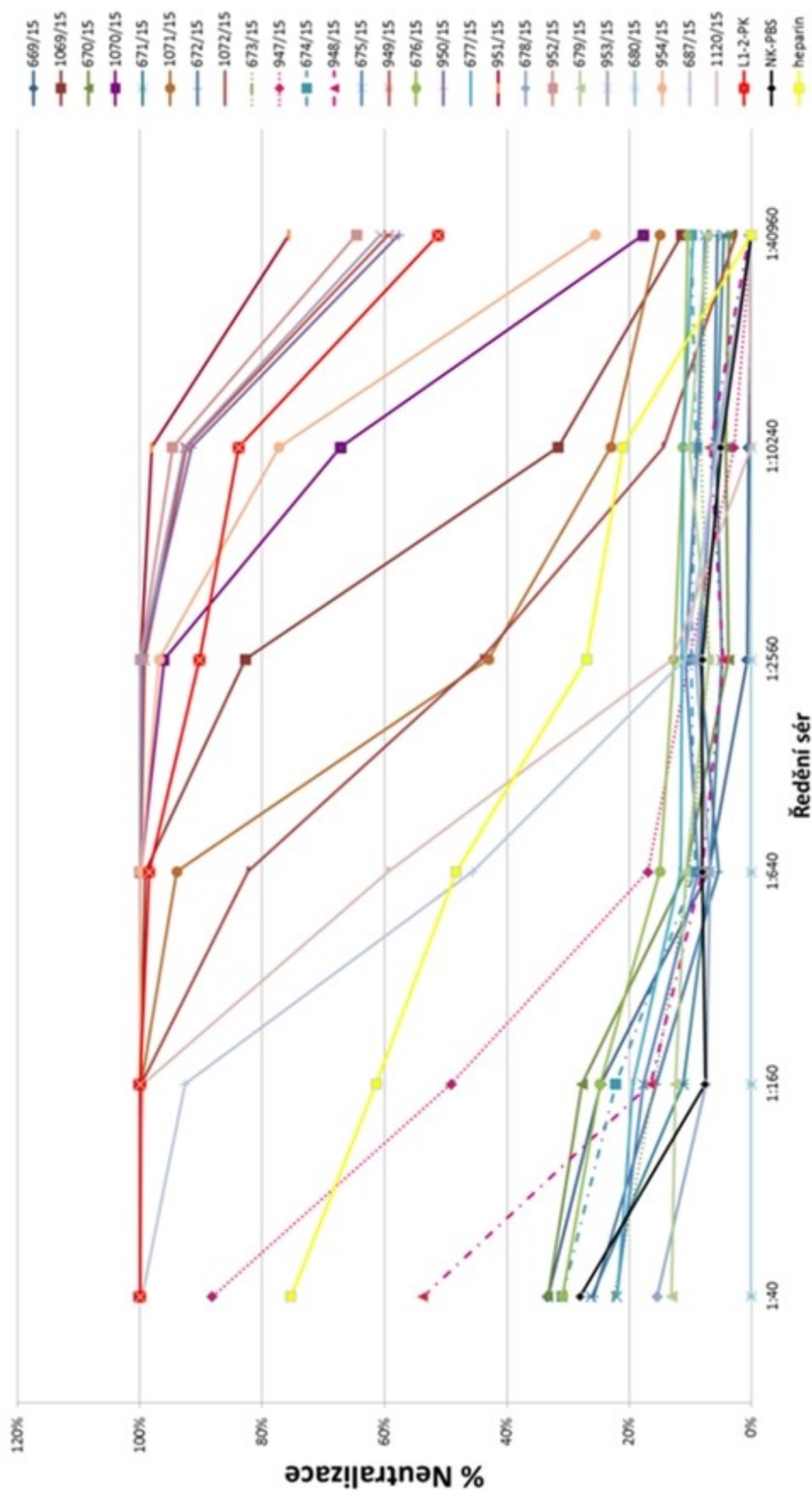
Myši Balb/C byly imunizovány nanostrukturami L1 VLPs BPV-1 a PBS (negativní kontrola) bez použití adjuvans. V každé skupině bylo 5 myší, detailněji je imunizace popsána v kapitole Materiál a metody. Přítomnost protilátek proti viru BPV-1 v krevních sérech myší odebraných čtrnáct dní po poslední imunizaci, byla testována metodou ELISA ve spolupráci s Mgr. Martinou Kojzarovou. L1 VLPs BPV-1 byly schopny vyvolat specifickou protilátkovou odpověď proti BPV-1, který byl získán z tkáňového homogenátu postiženého zvířete (obr. 34).



Obrázek 34: Protilátková odpověď proti BPV-1 vyvolaná imunizací myší pomocí L1 VLPs BPV-1 a PBS.

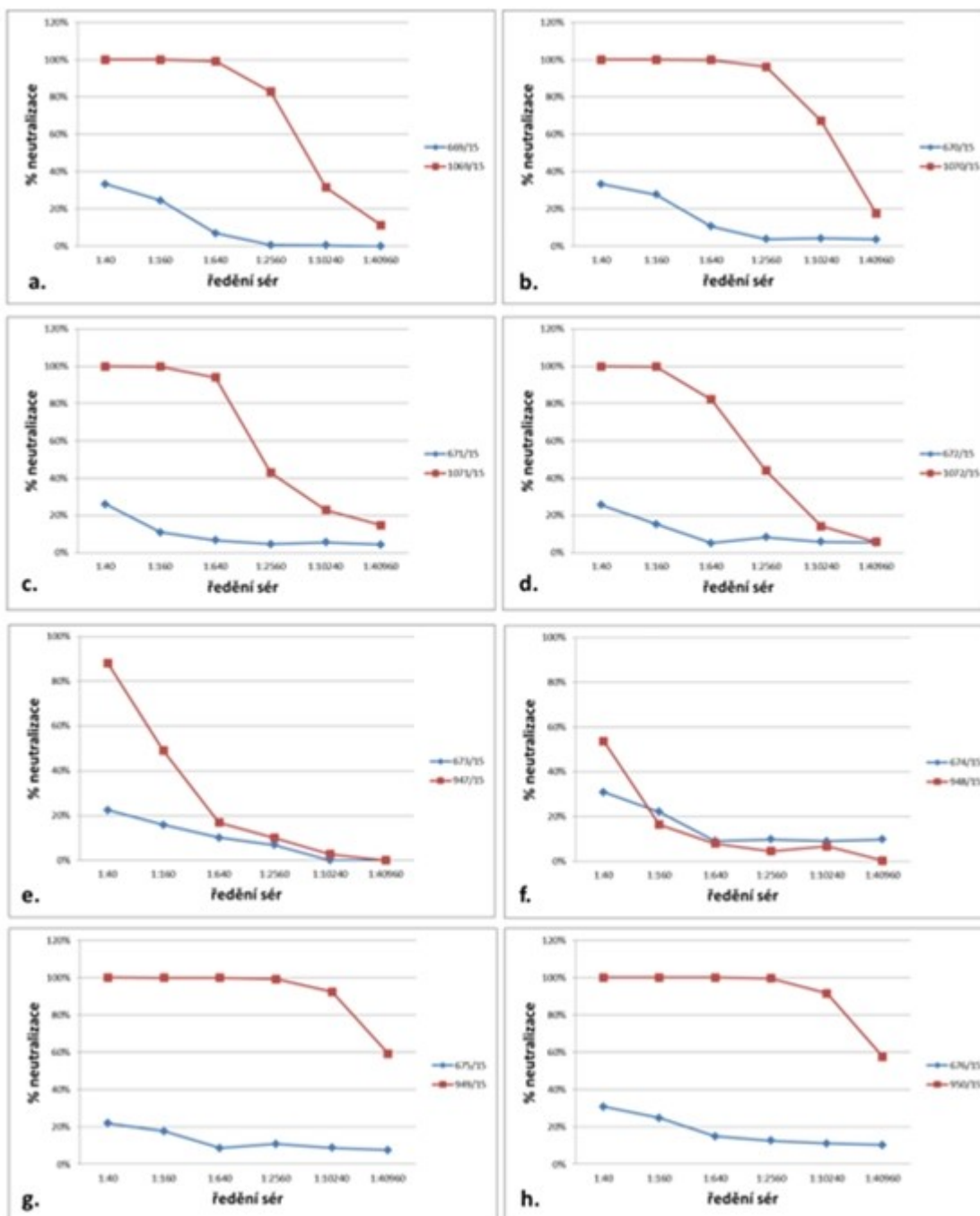
5.3.3.2 Test přítomnosti neutralizačních protilátek v sérech krav po vakcinaci L1 VLPs BPV-1

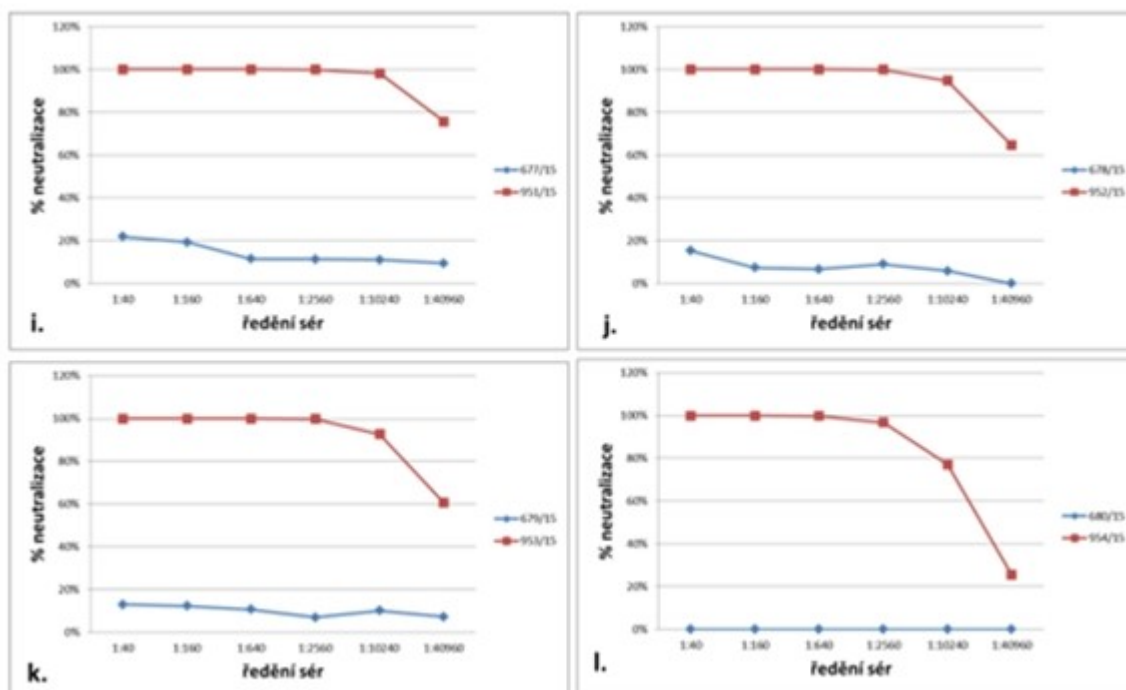
Dále jsme použili L1 VLPs BPV-1 k imunizaci skotu. K testování byla použita séra odebraná před imunizací a po třetí imunizaci (63. den experimentu) kandidátní vakcínou obsahující L1 VLPs BPV-1 (12 zvířat). Imunizace býků je podrobně posána v kapitole Materiál a metody. Ve všech sérech zvířat, která podstoupila vakcinaci VLPs došlo k dramatickému nárůstu neutralizačních protilátek po třetí imunizaci – séra prokazatelně obsahovala protilátky schopné interferovat s infekcí (neutralizovat) BPV-1 pseudoviriony i ve vysokém ředění (obr. 35 a 36). Séra imunizovaných zvířat neinterferovala s infekcí kontrolních HPV pseudovirionů (data neukázána), jedná se tedy o přítomnost specifických neutralizačních protilátek. Na získání těchto dat jsem spolupracoval s RNDr. Hanou Španielovou, PhD.



Obrázek 35 Stanovení neutralizačních protilátek.

Neutralizační protilátky byly stanoveny při různém ředění v sérech skotu před vakcinací (titrační křivky v modrých a zelených barvách) a po vakcinaci (titrační křivky ve fialovo-oranžových a hnědých barvách). V legendě je vždy uvedeno zvíře před imunizací (čísla 669/15–687/15) a po imunizaci (čísla 947/15–1120/15) za sebou. Žlutě je vyznačena kontrolní titrace heparinu – blokuje vstup pseudovirionů do buněk. Červeně je titrace kontrolního séra od myši vakcinované BPV-L1 VLP (L1-2-PK), černě od myši vakcinované PBS (NK-PBS). Čerchované a tečkované jsou zobrazeny titrační křivky séra zvakcinovaných placebo vakcinou. Kromě séra z kusu 687/15, který byl infikován papilomavíř před vakcinací, vykazují všechna séra skotu před imunizací nízkou hladinu neutralizačních protilátek. Ve všech sérech zvířat, která podstoupila vakcinaci VLPs (kromě kontrolních séra 947/15 a 948/15) došlo k dramatickému nárůstu neutralizačních protilátek po třetí imunizaci – séra prokazatelně obsahovala protilátky schopné interferovat s infekcí (neutralizovat) BPV-1 pseudoviriony i ve vysokém ředění (1:40960).





Obrázek 36: Test neutralizačních protilátek pro jednotlivá zvířata.

Neutralizační protilátky byly stanoveny při různém ředění v sérech skotu před vakcinací a po vakcinaci L1 VLPs BPV-1. V grafech (a) až (l) jsou zobrazena séra téhož zvířete: modře jsou značena séra před imunizací, červeně po třetí imunizaci. Grafy (e) a (f) ukazují testy u zvířat, která byla vakcinována placebo vakcínou.

5.4 Publikace týkající se vlastností hlavního kapsidového proteinu VP1 polyomavirů, které jsou součástí této práce a na kterých se autor podílel

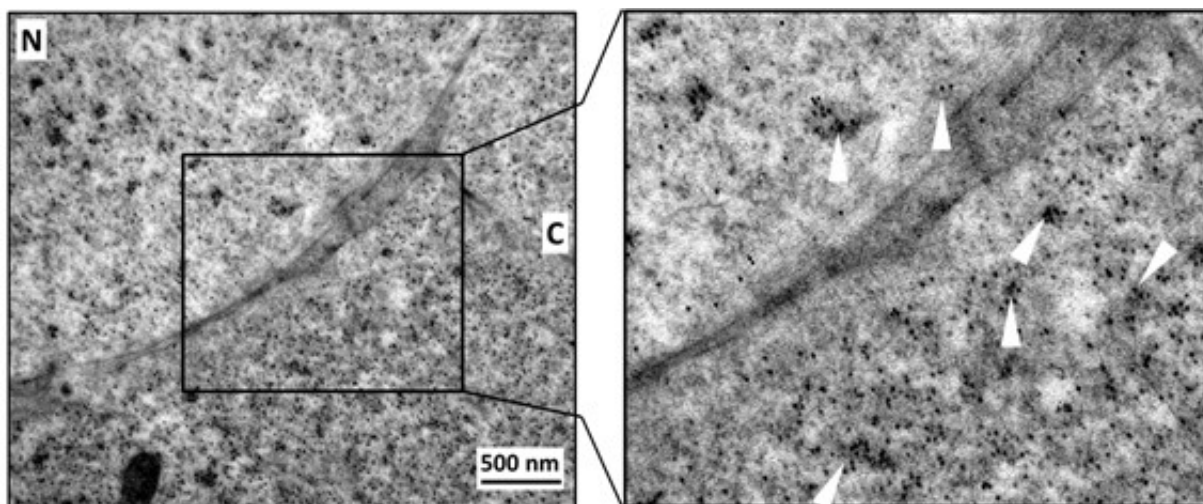
5.4.1 Hlavní strukturní protein VP1 myšího polyomaviru váže mikrotubuly, zvyšuje jejich acetylaci a zastavuje buněčný cyklus hostitelské buňky.

5.4.1.1 Překlad anglického abstraktu článku

Hlavní strukturní protein VP1 myšího polyomaviru (MPyV) je hlavní stavební jednotkou virové kapsidy. Pentamery proteinu VP1 jsou schopny se samy uspořádat do částic podobných kapsidám a nespecificky vázat DNA. Povrchové smyčky proteinu interagují s kyselinou sialovou na buněčných gangliosidových receptorech. I když replikační cyklus viru včetně morfogeneze virionů probíhá v jádře, velká část proteinu VP1 je detekovatelná v cytoplazmě buněk v pozdní fázi infekce MPyV. V této práci jsme v savčích buňkách, po transfekci plasmidem exprimujícím pouze VP1, detekovali tento protein většinou v cytoplazmě. Zde se VP1 vázal na mikrotubuly, včetně dělicího vřeténka a tato interakce vedla k zástavě buněčného cyklu v G2/M fázi. Dále jsme u buněk v pozdní fázi infekce MPyV a u buněk exprimujících VP1 pozorovali zvýšenou acetylaci mikrotubulů. Následně jsme chtěli objasnit, jak protein VP1 interaguje s mikrotubuly. Za interakci proteinu VP1 a mikrotubulů není zodpovědný dynein, jelikož ani zvýšení exprese p53/dynamitinu ani opůsobení buněk ciliobrevinem-D (inhibitor aktivity dyneinu) nezabránilo vazbě proteinu VP1 na mikrotubuly. Výsledky „pull-down“ analýzy proteinů interagujících s proteinem VP1 ukázaly na protein teplotního šoku 90 (Hsp90) a tento chaperon byl také detekován v komplexech proteinu VP1 s mikrotubuly. I když je známo, že Hsp90 asociuje s acetylovanými mikrotubuly, není zodpovědný za interakci proteinu VP1 s mikrotubuly. Naše studie přináší poznatky o roli hlavního strukturního proteinu v replikačním cyklu MPyV, které naznačují, že protein VP1 má celou řadu funkcí a účastní se regulace progresu buněčného cyklu v buňkách infikovaných MPyV.

5.4.1.2 Podíl autora této dizertační práce

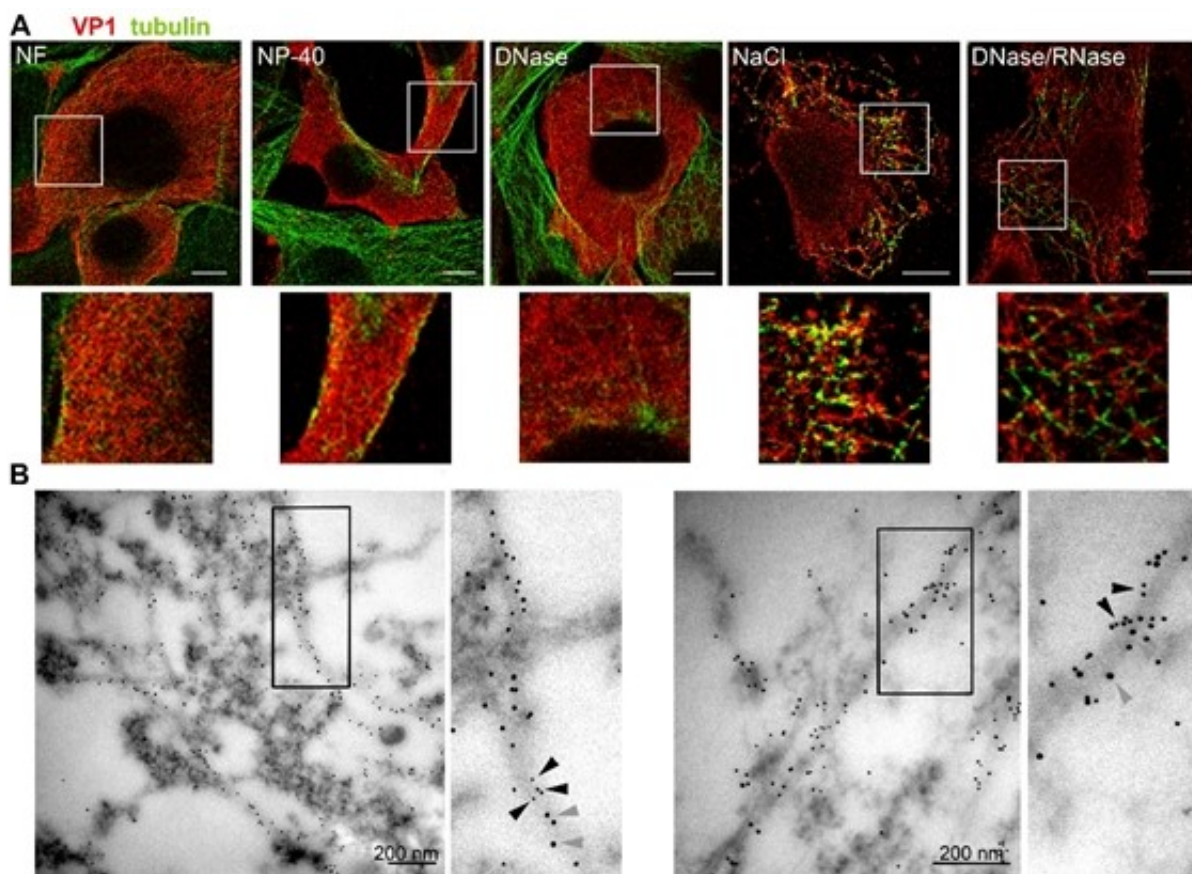
V průběhu projektu jsem analyzoval lokalizaci transientně exprimovaného proteinu VP1 v buňce metodou imunoelektronové mikroskopie. Na obrázku 37 je patrné, že protein VP1 se nachází převážně v cytoplazmě, i když malé procento značení lze pozorovat i v jádře buňky.



Obrázek 37: Lokalizace VP1 MPyV v cytoplasmě buněk WOP

VP1 MPyV je při samostatné expresi po transfekci z plasmidu lokalizován převážně v cytoplasmě. Buňky byly 24 hodin po transfekci seškrábány, fixovány metodou „high pressure freezing“ a zality do pryskyřice Lowicryl HM20 metodou mrazové substituce („freeze substitution“) N – buněčné jádro, C – cytoplazma, bílé šipky – protein VP1 značený pomocí 5 nm částic zlata.

Dále jsem potvrdil interakci proteinu VP1 s mikrotubuly. Na obrázku 38 můžeme pozorovat specifické značení proteinu VP1 (zlaté částice - 5 nm) podél tubulární struktury specificky označené protilátkou proti tubulinu (zlaté částice – 10 nm). Tato pozorování jsou v souladu s daty získanými pomocí fluorescenční mikroskopie a biochemickými analýzami.



Obrázek 38: Protein VP1 interaguje s mikrotubuly.

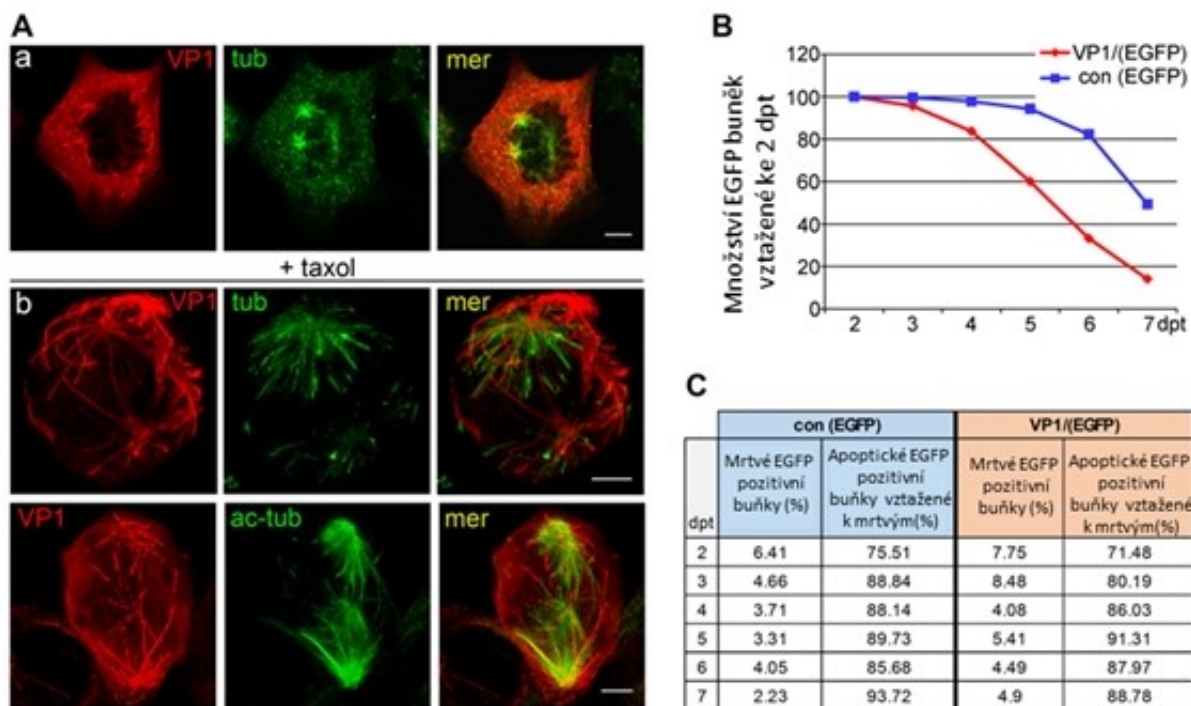
A) Buňky produkující VP1 byly in-situ frakcionovány. VP1 (červeně) a tubulin (zeleně) byly značeny specifickými protilátkami. Zvětšené detaily představují vybrané konfokální řezy. Měřítko – 8 μm .

B) Imunoelektronová mikroskopie buněk exprimujících VP1. Buňky byly inkubovány v pufru obsahujícím detergent NP-40, fixovány a zality do pryskyřice. Tubulin (černé šipky, 5 nm zlaté částice) a VP1 (šedé šipky, 10 nm zlaté částice) byly značeny specifickými protilátkami.

Dále jsem se zabýval dopadem vazby proteinu VP1 na mikrotubuly na fyziologii buňky. Nejprve jsem ověřil, jestli se protein VP1 váže také na mitotické mikrotubuly. I přes to, že bylo velmi těžké detekovat mitotické buňky, byla pozorována afinita proteinu VP1 k dělicímu vřeténku (Obr. 39Aa). Pro zvýšení počtu buněk v mitóze, byly buňky ošetřeny taxolem, látkou stabilizující mikrotubuly. V takto ošetřených buňkách vykazoval protein VP1 opět vysokou afinitu ke struktuře dělicího vřeténka, ale také byla pozorována vlákna pozitivní na protein VP1, která vystupovala z dělicího vřeténka (Obr. 39Ab).

Narušení stability mikrotubulů má za následek buď zastavení buněčného cyklu, nebo smrt buňky. Testoval jsem tedy, zda interakce proteinu VP1 s mikrotubuly, vedoucí k jejich petrifikaci, může narušit proliferaci buněk. Sledoval jsem množství buněk exprimujících VP1 (a EGFP pod kontrolou jiného promotoru) a kontrolních buněk (produkujících pouze EGFP) v čase. Pokud protein VP1 nemá vliv na průběh buněčného cyklu, bude počet buněk exprimujících protein VP1 s časem klesat ve stejné míře jako počet kontrolních buněk. Avšak,

množství buněk exprimujících protein VP1 klesalo strměji v porovnání s množstvím kontrolních buněk (Obr. 39 B). Toto pozorování naznačuje, že vazba proteinu VP1 na mikrotubuly narušuje proliferaci buněk.



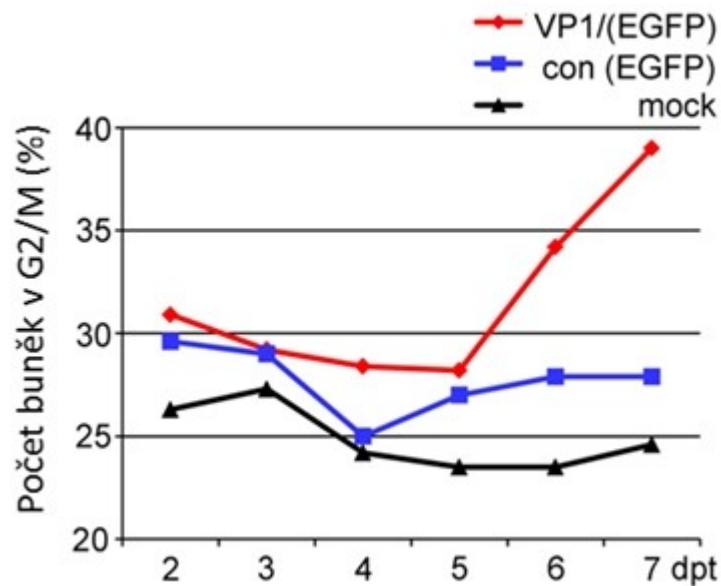
Obrázek 39: Protein VP1 ovlivňuje proliferaci buněk.

(A) Buňky WOP byly transfekovány plazmidem pVP1 a okamžitě po transfekci ošetřeny DMSO **(a)** nebo taxolem (rozpuštěným v DMSO) ve finální koncentraci 10 μ M **(b)**. Po 24 h byly buňky fixovány a protein VP1, tubulin nebo acetylovaný α -tubulin byly označeny specifickými protilátkami. Ukázány jsou maximální projekce z 35 sekci; úsečka: 8 μ m.

(B, C) Buňky WOP byly transfekovány plazmidem pWP (exprimující VP1 a EGFP) nebo pCont (exprimující pouze EGFP). Buňky byly inkubovány 2 dny a od tohoto bodu bylo průtokovou cytometrií měřeno relativní zastoupení buněk pozitivních na EGFP **(B)** nebo počet apoptotických buněk **(C)**. Ukázány jsou výsledky jednoho ze dvou nezávislých experimentů. Dpt – dny po transfekci.

Další možností bylo, že k úbytku buněk exprimujících VP1 dochází následkem jejich smrti. Pomocí průtokové cytometrie bylo ukázáno, že množství mrtvých buněk se s časem snižuje. Počet mrtvých buněk se pohyboval v rozmezí 6,4 (2 dpt) – 2,2 % (7 dpt) u buněk kontrolních a v rozmezí 7,7 – 4,9 % pro buňky exprimujících VP1 (Obr. 39 C). Většina mrtvých buněk jak u kontrolní populace, tak i u buněk exprimujících VP1 zemřela v následku apoptózy (obr. 39 C). Nakonec jsem se zaměřil na studium buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie. Ta prokázala, že u buněk exprimujících VP1 docházelo k akumulaci v G2/M fázi (obr. 40).

Tato data naznačují, že protein VP1 v pozdní fázi infekce podporuje zástavu buněčného cyklu po proběhnutí S-fáze a zabraňuje buněčnému dělení. Data z průtokové cytometrie jsou uvedena v příloze.



Obrázek 40: VP1 narušuje průběh buněčného cyklu.

Buňky linie WOP byly transfekovány plazmidem pWP (exprimující VP1 a EGFP) nebo pCont (exprimující pouze GFP). Buňky byly inkubovány 2 dny a od tohoto bodu bylo FACS analýzou měřeno množství buněk v G2/M fázi buněčného cyklu. Ukázány jsou výsledky jednoho ze dvou nezávislých experimentů. Dpt – dny po transfekci.

Experimenty související s fluorescenční mikroskopií byly prováděny ve spolupráci s RNDr. Lenkou Horníkovou, PhD. Experimenty související s měřením buněčného cyklu byly prováděny ve spolupráci s Mgr. Václavem Janovcem.

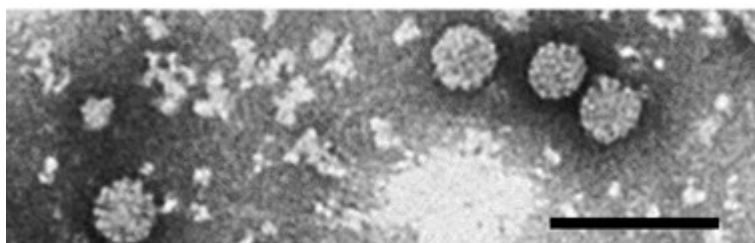
5.4.2 Enkapsidace myšího polyomaviru není závislá na sekvenčně specifickém enkapsidačním signálu.

5.4.2.1 Překlad anglického abstraktu článku

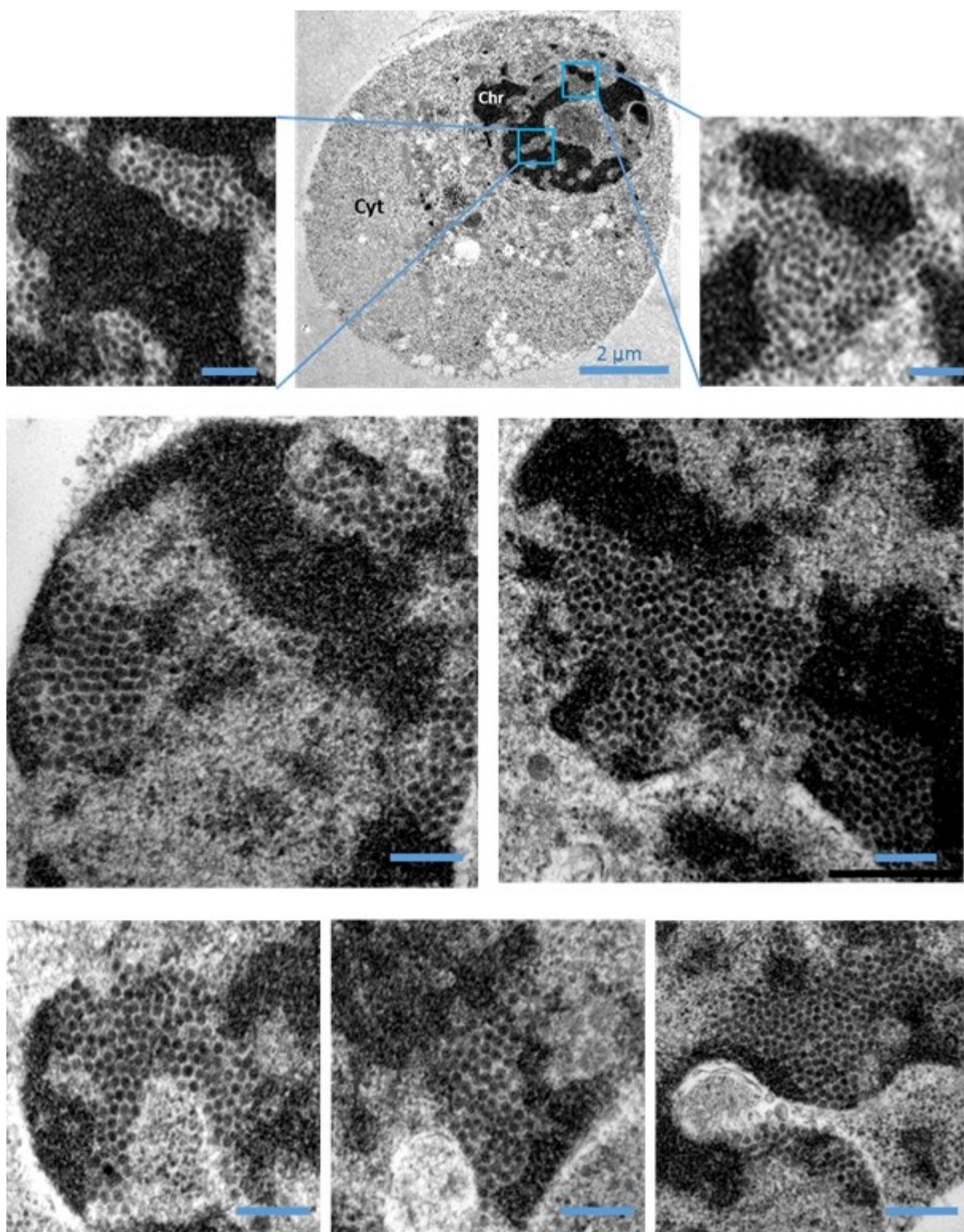
O myším polyomaviru (MPyV) se uvažuje jako o možném nástroji v genové terapii, současné poznatky o enkapsidaci jeho DNA do virionů jsou však nedostatečné. Provedli jsme řadu experimentů založených na enkapsidaci reportérového vektoru do pseudovirionů MPyV, abychom identifikovali možné *cis* elementy, které se podílejí na enkapsidaci DNA. Žádná ze sekvencí, které byly odvozené z genomu MPyV, sama o sobě nezvyšovala účinnost enkapsidace reportérového vektoru použitého při experimentech. Frekvence enkapsidace výrazně závisela na celkovém intracelulárním množství vektoru po transfekci. Ukázalo se, že enkapsidace cílové DNA je nespecifická a dále že je balena nereplikovaná DNA. Navrhujeme tedy, že hlavním faktorem, který určuje selekci DNA pro enkapsidaci, je koncentrace cílové DNA v místech morfogeneze virionů.

5.4.2.2 Podíl autora

Pro účely hledání *cis* elementů, které by se mohly podílet na enkapsidaci DNA, byl vyvinut expresní systém pro produkci pseudovirionů v buňkách 293TT. Pseudoviriony se pomocí tohoto systému podařilo úspěšně produkovat a purifikovat. Protein VP1 je však schopen samovolně se uspořádat do VLPs. Aby se vyloučila teoretická množnost, že částice se tvoří z proteinu VP1 až v průběhu purifikace skládáním v buněčném lyzátu, provedl jsem strukturní elektronmikroskopickou analýzu produkujících 293TT buněk na ultratenkých řezech. Elektronovou mikroskopií bylo potvrzeno, že virové částice mohou být purifikovány z buněčného lyzátu (obr. 41) a zároveň dochází k jejich formování v buněčných jádrech (obr. 42).



Obrázek 41: Elektronmikroskopický snímek purifikovaných MPyV částic z buněk 293TT.
Negativní barvení purifikovaných virových částic, měřítko 100 nm.



Obrázek 42: Elektronmikroskopické snímky MPyV částic produkovaných ve 293TT buňkách. Ultratenké řezy buňkami 293TT fixované 48 hodin po transfekci. Virové částice tvoří shluky uvnitř jádra v blízkosti kondenzovaného chromatinu. Cyt – cytoplazma, Chr – kondenzovaný chromatin, měřítko 200 nm, pokud není uvedeno jinak.

6. Diskuze

6.1 Vývoj veterinárních vakcín a diagnostických komponent

Tématem této části dizertační práce bylo vytvořit nové rekombinantní vakcíny proti PCV2 a BPV-1 a připravit univerzální platformy odvozených ze struktur MPyV pro přípravu veterinárních vakcín proti dalším patogenům. Představili jsme celkem tři univerzální platformy (VLP-A, VLP-B a Kapsomera-C) umožňující rychlé vkládání imunogenních epitopů, či celých proteinů do MPyV struktur. Tyto univerzální platformy mohou sloužit nejen k přípravě nových vakcín, ale umožňují i rychlou reakci na antigenní změnu patogenu, při které se vakcína stává neúčinnou. Příkladem může být právě vakcína proti PCV2. Všechny komerční vakcíny, které jsou v současné době dostupné na trhu jsou založeny na proteinu Cap pocházející z kmene PCV2a, i když v současnosti nejrozšířenějším kmenem je PCV2b. Současně vakcíny jsou schopné, díky křížové reaktivitě protilátek dobře chránit i proti infekci kmenem PCV2b (Opriessnig et al., 2014b, 2014a). Zatímco protein Rep PCV2 je poměrně konzervativní, hlavní antigenní determinanta viru, protein Cap, je poměrně variabilní a podléhá imunitní selekci (Olvera et al., 2007). PCV2 patří mezi viry vyznačující se perzistencí v hostiteli a imunita navozená vakcinací není sterilizační. To může vést k rekombinacím s divokými typy viru kolujících v přírodních rezervoárech a vzniku nových mutantů unikajících dohledu imunitního systému vakcinovaných prasat (Martin et al., 2011). Vliv vakcinace na genetickou diverzitu PCV2 v chovech je popsán v práci Kekarainen et al., 2014. Několik dalších publikovaných prací informuje o selhání vakcinace dostupnými komerčními vakcínami proti kmeni PCV2d (Seo et al., 2014; Xiao et al., 2012), zatím minoritnímu kmenu, jehož výskyt byl hlášen v chovech v Číně a USA. Souvislosti mezi vznikem nových kmenů PCV2 s vakcinací jsou shrnuty v práci Ssemadaali et al., 2015. Účinek vakcín proti novému patogenému PCV3, který byl nedávno popsán (Palinski et al., 2017), nelze zatím ani odhadnout. Tento model vzniku nových kmenů virů je popsán i u dalších virů, kde imunita navozená vakcinací není sterilizační. Příkladem může být HBV (Fitzsimons et al., 2005), AMPV („Avian metapneumovirus“) (Cecchinato et al., 2010), Markova choroba či virus infekční burzitidy drůbeže (IBDV) (Read et al., 2008).

Současným trendem je přechod od klasických veterinárních vakcín jako jsou autovakcíny vytvořené z částečně purifikovaných a inaktivovaných homogenátů z tkání postižených zvířat nebo vakcíny založené na inaktivovaném či atenuovaném patogenu k rekombinantním vakcínám. Vhodnost využití struktur MPyV jako kostry pro konstrukci těchto typů vakcín je dána jejich vlastnostmi. Vlastnosti, které předurčují struktury odvozené od MPyV k využití v přípravě vakcín, jsou jejich vysoká stabilita, silná efektivita produkce

v heterologních systémech, snadná purifikace, schopnost proteinu VP1 uspořádat se do vyšších struktur *in-vitro*, adjuvantní efekt, znalost 3D struktury, poměrně snadná manipulovatelnost a možnost vytvořit více variant nosičů s rozdílnou kapacitou pro velikost vkládaného cizího epitopu, či proteinu.

I když lze tyto struktury produkovat v různých expresních systémech, jako nejvýhodnější se nám jeví produkce v hmyzích buňkách, jehož cena se při stále rozsáhlejšímu používání tohoto expresního systému snižuje. Podstatnou výhodou, například proti bakteriálnímu expresnímu systému je, že VLPs jsou sestavovány již v hmyzích buňkách, zatímco z bakterií lze izolovat pouze pentamery VP1, ze kterých je nutno skládat VLPs *in-vitro*. Dalšími výhodami jsou možnost bezantibiotikové produkce, absence endotoxinů, či schopnost zajišťovat řadu postranlačních modifikací, které by mohly mít vliv na konformaci i imunitní odpověď proti produkovanému antigenu. Například u proteinu Cap PCV2 bylo identifikováno velké množství možných míst, která mohou být postranlačně modifikována glykosylací (Q. Liu et al., 2001). Význam většiny těchto modifikací není znám, ale glykosylace proteinu Cap PCV2 na aminokyselinové pozici 143 pravděpodobně ovlivňuje polarizaci imunitní odpovědi. Při experimentech s DNA imunizací proti PCV2 na myších, vedlo odstranění tohoto N-glykosylačního místa k posílení Th1 imunitní odpovědi (Gu et al., 2012).

V této práci jsme na základě již zmiňovaných univerzálních vektorů vytvořily celkem deset kandidátních imunizačních antigenů proti PCV2 (VLP-A – VarA1-A8, VLP-B – VarB, Kapsomera-C – VarC) odvozených od struktur MPyV. Po jejich produkci v hmyzích buňkách a následné purifikaci jsme ověřili jejich stabilitu metodou elektronové mikroskopie. Většina nanostruktur se ukázala jako stabilní, pouze nanostruktury VarA6 – VarA8 se skládaly opakovaně do chimerických VLPs velmi neúčinně a z dalších pokusů byly proto vyloučeny. Důvod, proč měly vložené epitopy VarA6 – 8 negativní vliv na stabilitu či účinnost uspořádání se do VLPs, se nám nepodařilo zjistit. Podle dostupných programů modelování terciální struktury (Swiss model, <https://swissmodel.expasy.org/>), by epitopy vložené zároveň s flexibilními linkery do povrchové DE smyčky neměly interferovat se zbytkem VP1 molekuly. To však neznamená, že tomu tak musí být. Z vyhodnocení bioinformatických metod modelování proteinových struktur na základě homologie s templáty vyplývá, že smyčky delší než 6 aminokyselinových zbytků jsou modelovány nepřesně (Dalton a Jackson, 2007).

Purifikované struktury byly vyšetřeny metodami SDS-PAGE a Western blot s následnou imunodetekcí pomocí specifických protilátek. Všechny testované struktury byly

stabilní a proteiny, ze kterých se skládaly vykazovaly očekávanou molekulovou hmotnost. U VarB (protein Cap PCV2 uvnitř VP1 VLP MPyV) jsme na základě separace proteinů pomocí SDS-PAGE s následným denzitometrickým měřením provedli odhad počtu molekul proteinu Cap uvnitř VLPs. Průměrný výsledek – 12 internalizovaných Cap molekul přibližně odpovídá výsledku dosaženého u jiných proteinů již dříve v naší laboratoři (Hrusková et al., 2009). Teoreticky by každá ze 72 pentamer, tvořících kapsidovou strukturu, mohla obsahovat jeden fúzní protein zakončený sekvencemi tVP3 interagujícími s centrální dutinou pentameru VP1. Nicméně počet internalizovaných molekul může být velmi variabilní v závislosti na tvaru vkládaného proteinu, ale i na vzájemných poměrech produkce VP1 a fúzního proteinu v buňkách. Abbing et al., 2004 produkovali VP1 a fúzní protein složený z EGFP a zkráceného proteinu VP2 v *E. coli* a nechali vytvořit chimerické VLPs složené z obou proteinů *in-vitro*. Množství molekul fúzního proteinu obsaženého v jedné VLP částici odhadli na 64. Naproti tomu Tegerstedt et al., 2005 odhadl, že 683 aminokyselinový protein Her2/neu fúzovaný s celým VP2 je obsažen v chimerických MPyV VLPs pouze v počtu tří molekul. Přesto tyto chimérické VLPs chránily Balb/c myši před progresí Her 2 exprimujícího tumoru (Tegerstedt et al., 2005).

U kandidátní vakcíny VarC jsme na elektronmikroskopických snímcích pozorovali komplexy větší, než by odpovídalo pentamerům VP1 MPyV. Rozhodli jsme se proto ověřit toto pozorování metodou BN-PAGE. Protože VP1 MPyV tvoří pentamerní struktury ihned po translaci, očekávali jsme velikost pentamerního fúzního proteinu cca 356 kDa. Překvapivě jediný proužek, který jsme detekovali touto metodou, odpovídal proteinovému komplexu o velikosti zhruba dvojnásobné (2x pentamer fúzního proteinu), přičemž většina materiálu vůbec nevstoupila do gelu. To potvrdilo naši teorii o formování vysokomolekulárních komplexů. Jedním z možných vysvětlení tvorby těchto komplexů je zesíťování pentamerních struktur pomocí proteinu Cap, který při produkci tvoří dimery spojené disulfidickou vazbou. Oblast zodpovědná za tvorbu těchto disulfidických vazeb se nachází v části mezi aminokyselinami číslo 51-103 (Wu et al., 2012).

Dále jsme se zaměřili na vyhodnocení schopnosti purifikovaných imunizačních antigenů indukovat protilátky proti PCV2 po imunizaci myší. Všechny testované chimerické nanostruktury byly schopné vyvolat tvorbu protilátek proti PCV2 v krevních sérech myších. V případě VarA1-VarA5, kde jsou imunogenní epitopy vloženy do povrchové smyčky, se potvrdila schopnost takto umístěných imunogenních epitopů zaujmout nativní konformaci odpovídající virionu PCV2. Podle očekávání nejvyšší titr protilátek proti PCV2 indukovala

VarB, která nese protein Cap ukrytý uvnitř VP1 VLP, což je v souladu s předchozími publikovanými výsledky z naší laboratoře (Fric et al., 2008; Hrusková et al., 2009).

Velká část antivirových vakcín indukuje protilátkovou odpověď proti povrchovým glykoproteinům (u obalených virů), u neobalených virů pak proti kapsidovým proteinům. Protivirové protilátky fungují nejlépe, pokud mají zároveň i neutralizační aktivitu a dokáží tedy zabránit infekci. Neutralizační efekt je zprostředkován v zásadě třemi hlavními mechanismy: i) neutralizační protilátky mohou agregovat virus a tím znemožnit jeho vstup do buňky, ii) neutralizační protilátky se vážou přímo do místa receptorového místa viru a znemožňují tak vazbu viru na buněčný receptor a jeho internalizaci, iii) neutralizace viru může proběhnout i po vstupu virové částice do buňky, a sice mechanismem zabránění rozvolnění virové částice – její petrifikací. Aby toho mohly neutralizační protilátky dosáhnout, je nezbytné, aby byly schopné rozpoznat povrchové proteiny viru v jejich nativním stavu. Neutralizační virové epitopy jsou i přes existenci lineárních epitopů (Dietzschold et al., 1990; Jagu et al., 2011; Kam et al., 2012) velmi často konformační a velmi často nejsou přítomné na monomerní formě kapsidového proteinu, proto jsou vakcinace monomerním kapsidovým proteinem často neúčinné.

Také v případě infekce PCV2 hraje protilátková odpověď, zejména neutralizační protilátky proti proteinu Cap, nejdůležitější roli. Celkový titr protilátek proti PCV2 mezi prasaty vykazujícími onemocnění PCV2-SD a mezi prasaty, která prodělala subklinickou infekci, se neliší (Meerts et al., 2006). Podstatným rozdílem ale je, že prasata postižená PCV2-SD mají nízké titry neutralizačních protilátek jejichž množství koreluje s množstvím viru (Fort et al., 2007). Rozhodli jsme se tedy ověřit schopnost chimérických nanostruktur indukovat vznik neutralizačních protilátek proti PCV2 neutralizačním testem sér. Všechna séra izolovaná z myší imunizovaných chimérickými nanostrukturami VarA1-5 způsobila při ředění 1:50 pokles infektivy PCV2 v tkáňové kultuře prasečích ledvinových buněk PK15 přibližně o 50 %. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben faktem, že imunogenní epitopy proteinu Cap PCV2 použité v chimérických nanostrukturách, jsou na povrchu virionu v těsném sousedství (obr. 26, kapitola Charakterizace imunitní odpovědi chimérických nanostruktur v myším modelu) a mohou být tedy součástí neutralizačního konformačního epitopu. Vazba protilátek do části tohoto epitopu by pak svým stérickým účinkem mohla působit částečnou neutralizaci PCV2. Zdvojení imunogenního epitopu PCV2 v nanostruktuře VarA5 nemělo žádný účinek na zvýšení titru neutralizačních protilátek. Nejvyšší neutralizace PCV2 (85 %) bylo dosaženo při testování séra pocházejícího z myší imunizovaných nanostrukturou VarC. Porovnání našich výsledků

s literaturou je v tomto případě velice obtížné. Řada autorů ve svých pracích zařazuje testy neutralizace PCV2 (Dong et al., 2013; Lekcharoensuk et al., 2004; Meerts et al., 2006; Opriessnig et al., 2008a; Pogranichnyy et al., 2000; Wang et al., 2006, 2007). Tyto testy nejsou ale nijak standardizovány, ať už z hlediska ředění myších sér, množství použitého viru, či interpretace výsledků. Procento blokace virové infekce, při kterém autoři prohlašují protilátku, či sérum za PCV2 neutralizační, stanovují často na základě vlastního úsudku, bez kontextu s literaturou.

Nanostruktura VarC se v testech neutralizace PCV2 ukázala jako varianta indukující v myších nejvyšší titr virus neutralizačních protilátek. Navíc bylo v pilotních *in-vitro* experimentech detekce buněčné imunitní odpovědi (výsledky viz příložená publikace) ukázáno, že tato nanostruktura indukuje kromě aktivace CD4⁺ T lymfocytů, také zvýšení frekvence CD8⁺ buněk a CD19⁺ buněk exprimujících časný aktivační marker CD69. Kromě toho, jako jediná z testovaných nanostruktur, indukovala produkci IFN- γ . Proto byla nanostruktura VarC vybrána pro další imunologické testy na cílovém organismu – prasatech. Provedli jsme celkem dva imunizační pokusy, první na laboratorním kmeni prasat MeLiM, druhá skupina byla prasata různých plemen z komerčního chovu, která měla simulovat podmínky reálného chovu. Z nanostruktury VarC byla připravena kandidátní vakcína, která obsahovala 30 % komerčního adjuvans Polygen. Pro srovnání jsme zvolili komerční vakcínu Circoflex, která je vakcínou používanou v českých chovech. Ještě před počátkem imunizací jsme u prasat ověřili metodou RT-PCR nepřítomnost genomů PCV2 v krevních sérech, tedy skutečnost, že v chovu neprobíhá aktivní infekce, která by mohla zkreslit výsledky imunizačních pokusů.

PCV2 virus je rozšířen po celém světě prakticky ve všech chovech (Segalés, 2012). To znamená, že všechna chovaná prasata přišla patrně do styku s tímto virem a mají bazální hladinu protilátek proti proteinu Cap PCV2 včetně selat, kde byl prokázán přenos protilátek proti PCV2 z matek laktací (Opriessnig et al., 2008b). Ke stanovení hladiny protilátek proti PCV2 v krevních sérech imunizovaných prasat jsme použili komerční sadu ELISA kit INgezim Circo IgG, která obsahuje standard, pomocí kterého lze na základě hladiny naměřených protilátek spolehlivě určit prasata sérologicky pozitivní.

Oba imunizační pokusy vykazovaly z hlediska profilu indukce protilátek proti PCV2 podobný průběh. Ve 28 dní po imunizaci byl naměřen signifikantní nárůst protilátek proti PCV2 u skupin prasat imunizovaných kandidátní vakcínou VarC a komerční vakcínou Circoflex. Hladina protilátek proti PCV2 prasat imunizovaných VarC byla signifikantně vyšší než hladina

protilátek dosažená imunizací vakcínou Circoflex. Nicméně u VarC jsme zaznamenali rychlejší pokles protilátek proti PCV2, než tomu bylo u komerční vakcíny. Ve 49 dní byl rozdíl statisticky nevýznamný. Den 91 byla hladina protilátek u skupiny imunizované VarC signifikantně nižší než u skupiny imunizované vakcínou Circoflex a blížila se hranici testem stanovené negativity. Předpokládáme, že tento problém vyřešíme změnou adjuvans, nebo změnou postupu zpracování směsi adjuvans a imunizačního antigenu.

V první skupině prasat byla na začátku pokusu naměřena zvýšená hladina protilátek proti PCV2. Jedná se zjevně o mateřské protilátky (selata byla ve věku šesti týdnů) a u kontrolní skupiny prasat imunizovaných slepou vakcínou postupně vymizely. Ve druhém pokusu, kde byly imunizovány kusy ve věku 1-4 let, se tyto mateřské protilátky již nevyskytovaly.

Nejdůležitější charakteristikou kandidátní vakcíny je přítomnost virus neutralizačních protilátek, které jsme stanovili stejným postupem, jako v případě imunizačních pokusů prováděných na myších. Neutralizace PCV2 séry získaných z prasat je při ředění sér 1:100 prakticky shodná s neutralizační schopností sér prasat ze skupiny imunizované vakcínou Circoflex. Výsledky testů kandidátní vakcíny VarC jsou srovnatelné s účinky vakcíny Circoflex, a tedy slibné pro komerční využití. Bylo požádáno o patentovou ochranu. V současné době se podílíme s firmou Dyntec na experimentech, které umožní tuto vakcínu převést so výrobní fáze a připravit k registraci.

Vlastnost proteinu L1 BPV-1 tvořit VLPs a vyvolat specifickou protilátkovou odpověď včetně tvorby neutralizačních protilátek byla v odborných publikacích dokumentována již dříve. Do dnešní doby není na trhu dostupná vakcína proti tomuto onemocnění, ale vzhledem k šíření infekce BPV-1 související patrně se změnou způsobu chovu skotu, se objevuje výrazná poptávka po vakcíně proti BPV-1. To se odráží i ve vzniku nových studií zabývajících se vývojem účinné cenově dostupné vakcíny, viz Přehled literatury. V této práci jsme připravili rekombinantní bakulovirus pro produkci L1 VLPs BPV-1. Pomocí neutralizačního testu založeného na pseudovironech (Pastrana et al., 2004) jsme otestovali schopnost krevních sér imunizovaného skotu neutralizovat virus. Ve všech sérech zvířat, která podstoupila vakcinaci L1 VLPs došlo po třetí imunizaci k dramatickému nárůstu neutralizačních protilátek. Séra prokazatelně obsahovala protilátky schopné interferovat s infekcí BPV-1 pseudoviriony i ve vysokém ředění (1:40960). Podobných výsledků v neutralizaci BPV-1 krevními séry dosáhli i autoři Hainisch et al., 2012 při pokusech prováděných na koních. Ve snaze posílit ochranu imunizovaných zvířat i proti jiným typům papilomavirů jsme se zaměřili i na využití vedlejšího

kapsidového proteinu L2. Schopnost neutralizačních protilátek namířených proti epitopu na N-konci L2 křížově reagovat s jinými typy papilomavirů, včetně lidských, byla již publikována (Jagu et al., 2011; Pastrana et al., 2005). I když je možné připravit L1/L2 VLPs, množství L2 proteinu vzhledem k L1 v kapsidě je nízké a imunitní odpověď proti L2 je slabá. Abychom zastoupení zastoupení epitopu L2 v kandidátní vakcíně posílili, rozhodli jsme se vytvořit směsnou vakcínu složenou z L1 VLPs a chimérických pentamerních nanočástic složených z fúzního proteinu VP1-L2₁₁₈₈-His. Podobně se i řada jiných autorů snažila ve svých pracích najít cestu, jak zvýšit nízkou imunogenicitu L2, např. konstrukcí různých peptidových konkatemerů, nebo fúzí s různými imunitu aktivujícími molekulami, či využitím nosičů odvozených od bakterií a virů vystavujících na svém povrchu epitopy L2 proteinu. Přehled těchto metod je přehledně popsán v recentním přehledovém článku Schellenbacher et al., 2017.

V současné době se podílíme s firmou Dyntec na experimentech, které umožní kandidátní vakcínu L1 VLPs BPV-1 chráněnou přihlášeným užitným vzorem převést do výrobní fáze a připravit k registraci. Zároveň pracujeme na dokončení imunologických testů kandidátní vakcíny VP1-L2₁₁₈₈-His.

6.2 Interakce hlavního kapsidového proteinu VP1 myšího polyomaviru s mikrotubuly

Charakteristickou vlastností neobalených virů je kompaktní genom s omezenou kódující kapacitou. Jejich genové produkty jsou proto většinou multifunkční. Například LT antigen polyomavirů, zajišťuje několik funkcí (vazba pRb a p53, transkripční faktor a iniciace replikace) pro které větší DNA viry (např. papilomaviry, či adenoviry) kódují specializované proteiny. I kapsidové proteiny, které mají primárně strukturní funkci, mohou mít další funkce v průběhu životního cyklu viru jako je regulace translace (Boni et al., 2005), buněčného cyklu (Wang et al., 2012) nebo virové transkripce (Guo et al., 2011).

O vlastnostech kapsidových proteinů MPyV týkajících se jejich funkcí v časně fázi virové infekce a stavby virové částice je známo poměrně velké množství poznatků. Jiná je situace v oblasti interakcí těchto proteinů s proteiny hostitelských buněk v pozdní fázi virové infekce. Je zde několik dosud nezodpovězených otázek, týkajících se morfogeneze virionu a funkcí buněčných proteinů interagujících s kapsidovými proteiny, které se na tomto procesu podílejí. Předpokládá se také existence dalších, dosud neobjevených funkcí kapsidových proteinů. V této práci jsme se zaměřili na hledání nových interakcí buněčných proteinů hostitelských buněk s hlavním kapsidovým proteinem VP1 MPyV.

Protože VP1 obsahuje ve své sekvenci NLS, očekávali jsme jeho lokalizaci v buněčném jádře. Nicméně při experimentech s individuální expresí tohoto proteinu v savčích buňkách jsme pozorovali VP1 především v cytoplasmě. V souladu s naším pozorováním jsou i výsledky autorů Shishido-Hara et al., 2004, kteří u příbuzného polyomaviru JCV pozorovali akumulaci VP1 v cytoplasmě při jeho samostatné expresi.

Oproti tomu při expresi proteinu VP1 MPyV z rekombinantních virů vakcínie (Stamatos et al., 1987) a rekombinantního bakuloviru (Forstová et al., 1993) byl protein VP1 lokalizován převážně v jádře. Nicméně tyto produkční systémy jsou založeny na DNA virech s velkým genomem, které kromě VP1 MPyV produkují celou řadu dalších vlastních virových proteinů. Lze tedy předpokládat, že některý z těchto proteinů může usnadňovat transport VP1 do jádra.

Podobně v případě koexprese proteinu VP1 s minoritními kapsidovými proteiny VP2 a VP3 je protein VP1 úspěšně transportován do buněčného jádra. Zastupitelnost NLS polyomavirových strukturních proteinů již byla popsána (Cai et al., 1994; Ishii et al., 1994), nicméně naše výsledky ukazují, že přítomnost NLS proteinů VP2 či VP3 je naprosto nezbytná pro úspěšný transport VP1 do buněčného jádra. V práci Schowalter a Buck, 2013 týkající se

MCPyV autoři pozorovali jiný efekt, ale podobného významu. Při samostatné expresi proteinu VP1 MCPyV byl tento kapsidový protein narozdíl od MPyV a JCV lokalizován většinou v jádře, zatímco při samostatné produkci VP2 MCPyV pozorovali lokalizaci tohoto minoritního proteinu v cytoplasmě. Při současné expresi proteinů VP1 a VP2 MCPyV byly oba proteiny detekovány v buněčném jádře. V průběhu infekce polyomavirů totiž dochází k formování komplexu pentamer VP1 s minoritními proteiny v cytoplasmě. Tyto komplexy jsou pak transportovány do jádra, kde dochází k formování virionů. Tento mechanismus patrně zajišťuje přítomnost kapsidových proteinů v jádře ve správných stechiometrických poměrech. Oba minoritní proteiny VP2 i VP3 jsou také naprosto nezbytné pro infektivitu MPyV (Mannová et al., 2002). Toto může být pravděpodobně způsob, jakým je bráněno zabudování pentamer VP1 bez inkorporovaných minoritních proteinů do virových částic, tedy vzniku neinfekčních virionů.

Buňky infikované MPyV mají zastavený buněčný cyklus v S, nebo G2/M fázi (Lehman et al., 1994; Schlegel a Benjamin, 1978). Pozdější studie životního cyklu MPyV ukázaly, že infikované buňky od počátku infekce projdou minimálně dvěma buněčnými cykly (Chen a Fluck, 2001). V prvním cyklu dochází k prodlužování S fáze buněčného cyklu a zastavení přechodu z G do M fáze (Dahl et al., 2005). Autoři v práci Dahl et al., 2005 ukazují, že toto první zastavení buněčného cyklu je spojeno s replikací virové DNA. V pozdější práci Pores Fernando et al., 2015 je prokázán vliv nadprodukce ST antigenu na zastavení buněčného cyklu ve fázi mitózy.

V naší práci jsme prokázali vazbu proteinu VP1 na systém mikrotubulů, což vede k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. Schopnost VP1 ovlivňovat buněčný cyklus vyplývala i z už dříve provedených pokusů v naší laboratoři. Při produkci VP1 v kvasinkovém expresním systému jsme pozorovali zastavení růstu kvasinkových kolonií, který se obnovil až po několika dnech. Při analýze buněk kvasinek metodou nepřímé imunofluorescence jsme pozorovali vazbu proteinu VP1 na mikrotubuly dělicího vřeténka, což vedlo k jejich petrifikaci a bránilo buněčnému dělení. Po několika dnech však buňky kvasinek vytvořily nové, boční dělicí vřeténko a tím obnovily schopnost buněčného dělení (Palková et al., 2000a). Vazba VP1 na mikrotubuly dělicího vřeténka byla také pozorována v buňkách časných epiteliálních nádorů myši indukovaných infekcí MPyV. Toto pozorování vedlo k teorii, že tato vazba může být zodpovědná za poruchy v procesu buněčného dělení a vznik aneuploidie v buňkách nádoru (Talmage et al., 1992). V pozdějších fázích vývoje nádorů však byla exprese proteinu VP1 potlačena (Holländerová et al., 2003). Souvislost mezi expresí VP1 a zastavení buněčného

cyklu je také popsána v práci autorů (Spink a Fluck, 2003), kteří při experimentech s mutantními viry neschopných produkce MT a ST antigenů a při zachování exprese proteinu VP1 pozorovali zastavení infikovaných buněk v G2/M fázi buněčného cyklu.

Zatímco tedy časné virové antigeny, které ovlivňují replikaci virového genomu, jsou zapojeny v blokaci prvního buněčného cyklu po infekci, protein VP1 je zapojen v zastavení druhého cyklu, což pravděpodobně umožňuje dokončení morfogeneze virionů.

6.3 Studium podmínek pro enkapsidaci DNA během morfogeneze virionů

Enkapsidace nukleové kyseliny do kapsid DNA virů nebo RNA virů bývá často, mimo jiné, řízena *cis* elementy – tzv. enkapsidačními signály. Sekvence enkapsidačního signálu byly např. popsány např. u herpesvirů (Stow et al., 1983) nebo adenovirů (Hearing et al., 1987) a mnohých RNA virů jako např. u retrovirů (Ali et al., 2016).

Polyomavirové kruhové DNA genomy se nacházejí v infikovaných buňkách ve formě minichromosomu v komplexu s buněčnými histony. Během morfogeneze virionů dochází k vytěsnění histonu H1 patrně kapsidovým proteinem VP1, který má sekvenčně nespecifickou afinitu k DNA a ke kondenzaci minichromosomu. Předpokládá se, že morfogeneze virionů polyomavirů neprobíhá soukáním DNA do preformovaných kapsid, ale kapsomery se patrně uspořádávají kolem minichromosomu.

U viru SV40 byla při studiu enkapsidace různých delečních mutant vytipována krátká sekvence v regulační oblasti v místě rozpoznávaném jako enhancer transkripce, poblíž replikačního počátku, která se ukázala jako nezbytná pro účinnou enkapsidaci SV40 minichromosomu (Oppenheim et al., 1992). Autoři nazvali tuto sekvenci „SES“ („SV40 encapsidation signal“) a postulovali, že rozpoznání ses sekvence a zahájení morfogeneze virionů je zprostředkováno buněčným transkripčním faktorem Sp1, který se váže do regulační oblasti SV40 genom (která v minichromosomu nebývá pokryta nukleozomy) a zároveň má také vazebnou afinitu k minoritním kapsidovým proteinům VP2 a VP3 a tedy i ke kapsomerám složeným z pěti molekul VP1, obklopujících jednu molekulu VP2 nebo VP3. Podle uvedené studie, Sp1 navádí první kapsomery do svého vazebného místa a tak zahajuje morfogenezi virionů (Gordon-Shaag et al., 2002).

Také genom myšího polyomaviru má v regulační oblasti vazebná místa pro buněčné transkripční faktory. Kandidátem na funkci podobnou té popsané pro Sp1 u viru SV40 byl transkripční regulátor a protein vázající se na jadernou matrix – YY1. Tento faktor má 3 vazebná místa v regulační oblasti genomu MPyV a jedno vazebné místo v genu pro hlavní kapsidový protein VP1. Ve společné studii naší laboratoře a laboratoře Univerzity La Sapienza, Itálie, bylo navíc ukázáno, že YY1 interaguje přímo s proteinem VP1 (Palková et al., 2000b).

Při expresi kapsidových proteinů MPyV v hmyzích buňkách bylo v naší laboratoři dříve pozorováno, že kromě prázdných VLPs nebo VLPs obsahujících fragmenty „nahé“ DNA byly tvořeny také tak zvané „plné VLPs“. Jejich analýza ukázala, že obsahují fragmenty DNA hmyzích buněk nebo bakulovirového původu v komplexu s histony hmyzích buněk. Tyto fragmenty měly jednotnou délku, odpovídající velikosti polyomavirového genomu [(cca 5kbp) (Palková et al., 2000a). Southern blot analýza ukázala, že výběr fragmentů nebyl zcela nahodilý

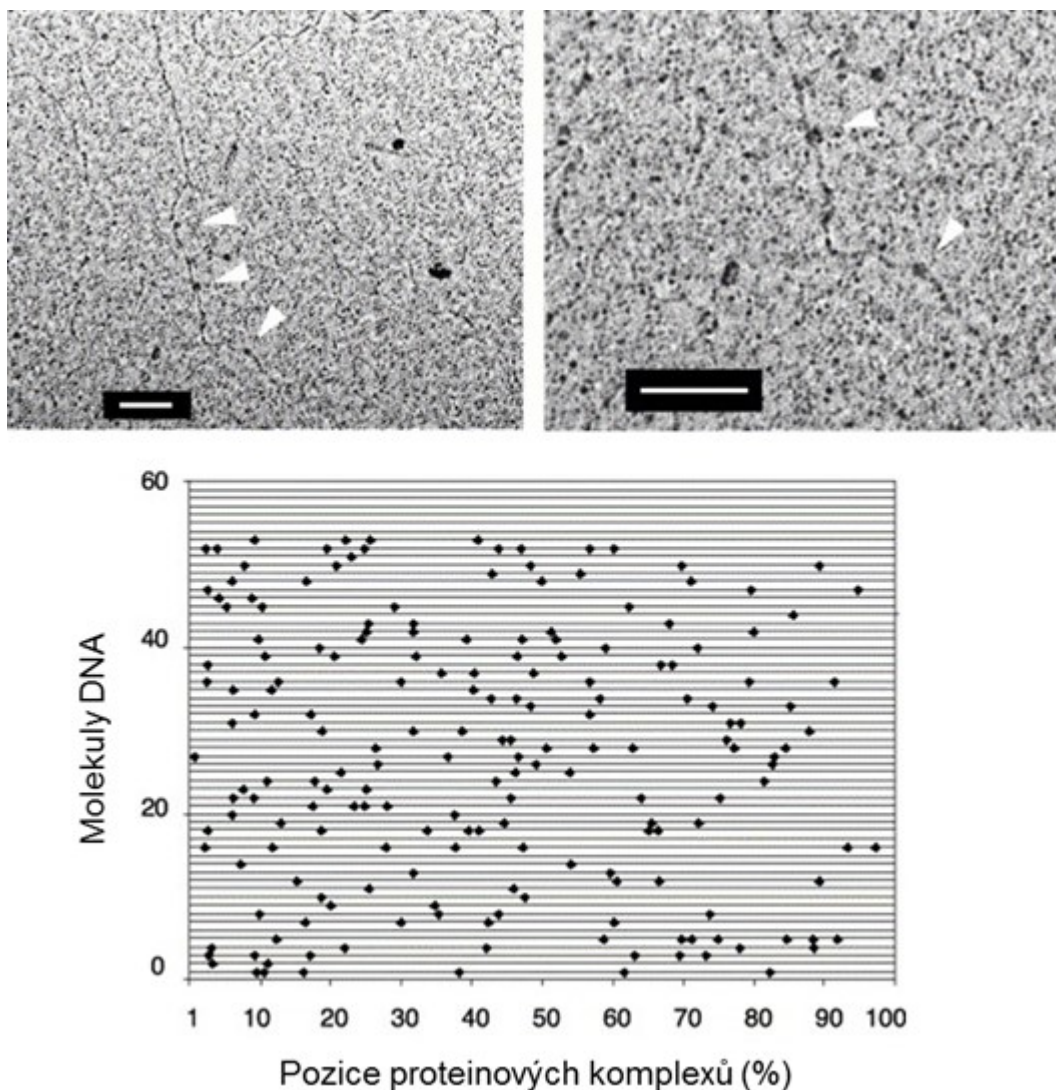
(výskyt silnějších proužků na pozadí ostatních). Jedním z možných vysvětlení bylo, že se jedná o úseky DNA, které obsahovaly transkripční regulační oblasti, případně replikační počátky.

Pro pátrání po enkapsidačním signálu MPyV jsme v této práci použili technologii pseudovirionů. Tato technologie byla vyvinuta pro papilomaviry i polyomaviry Christopherem Buckem (Buck et al., 2004) a spočívá v kotransfekci pomocného plasmidu exprimujícího překódované kapsidové proteiny (znevýhodněného pro enkapsidaci svou velikostí) a replikujícího se reportérového vektoru, který je v buňkách enkapsidován. Pseudoviriony jsou pak použity k „pseudoinfekci“ jejíž účinnost může být měřena expresí reportérového genu. Byla konstruována řada reportérových vektorů o velikosti polyomavirového genomu, z nichž každý nesl jiný fragment polyomavírové DNA. Fragmenty pokrývaly překryvným způsobem celý genom. Do reportérových vektorů byl také vložen ORI SV40, zajišťující jejich replikaci. Očekávalo se, že fragment obsahující polyomavírový enkapsidační signál ovlivní pozitivně účinnost enkapsidace. Výsledky pokusů však překvapivě ukázaly, že žádný z fragmentů nezesílil přesvědčivě enkapsidaci reportérového vektoru. Míra enkapsidace odrážela spíše množství vektorové DNA přítomné v buňce po transfekci. Experimenty s pseudoviriony tak ukázaly, že výběr DNA pro enkapsidaci je spíše řízen její dostupností a lokální koncentrací než cis elementem na enkapsidované DNA. Studie také prokázala, že enkapsidovat se může i nereplikující se DNA.

Vzhledem k tomu, že VP1 MPyV je schopen se velmi účinně skládat do VLPs *in-vitro*, byla v práci použita elektronová mikroskopie ultratenkých buněčných řezů k průkazu toho, že jsou pseudoviriony tvořeny účinně v jádře transfekovaných buněk, a nikoliv převážně nespecificky v buněčném lyzátu během izolace.

Je zajímavé, že dva relativně úzce příbuzné viry by měly zcela odlišný mechanismus enkapsidace. Příčinou mohou být odlišné vlastnosti kapsidových proteinů. Např. všechny tři kapsidové proteiny viru SV40 mají afinitu k DNA, zatímco VP2 a VP3 MPyV s DNA neinteragují. Také způsob interakcí kapsidových proteinů s transkripčním faktorem je odlišný. Nicméně je zajímavé, že mutanta SV40, která postrádá minoritní proteiny (o kterých se předpokládá, že sprostředkovávají vazbu kapsomer k Sp1) enkapsiduje DNA účinně (Nakanishi et al., 2007), podobně jako odpovídající mutanta MPyV (Mannová et al., 2002).

Při ověřování schopnosti transkripčního faktoru Sp1 navádět kapsomery do „SES“ sekvence v regulační oblasti genomu SV40, se ukázalo, že komplexy Sp1 s kapsomery vytvářené v přebytku molekul Sp1, se v *in-vitro* podmínkách váží na izolované genomy (bez kontextu chromatinových struktur) nahodile (Roitman-Shemer et al., 2007), (obr. 43).



Obrázek 43: Lokalizace proteinových komplexů SP1 a VP1ΔC5VP3 na SV40 DNA.

Vzdálenost navázaných proteinových komplexů je vyjádřena v procentech vztažených k celkové délce molekuly DNA. DNA molekuly jsou znázorněny jako linie, proteinové komplexy kosočtverci. Bílé šipky – proteinové komplexy navázané na molekule DNA. Převzato a upraveno z (Roitman-Shemer et al., 2007).

Je možné, že rozpoznání enkapsidačního signálu vbru SV40 závisí na kontextu genomu v buňkách, je rovněž možné že selekce genomů MPyV je dána lokálním uspořádáním a dostupností genomů. V každém případě bude zapotřebí dalšího výzkumu k pochopení mechanismu morfogeneze polyomavirů.

7. Závěr

V této práci byly získány následující výsledky:

- **Byla navržena a konstruována univerzální vektory pro vkládání cizích epitopů nebo celých proteinů do nanostruktur odvozených od strukturních proteinů myšího polyomaviru (MPyV) pro účely produkce chimérických struktur v hmyzích buňkách.**
 - Byl připraven univerzální konstrukt pro vkládání cizích epitopů do povrchové DE smyčky hlavního kapsidového proteinu VP1 MPyV pro přípravu VLPs MPyV s epitopy cizích proteinů na jejich povrchu.
 - Byl připraven univerzální konstrukt umožňující fúzi cizích peptidů a proteinů s C-koncem kapsidového proteinu VP1 MPyV pro přípravu chimerických kapsomerních struktur.
- **S použitím zkonstruovaných univerzálních vektorů byly připraveny potenciální rekombinantní vakcíny proti PCV2.**
 - Byly připraveny rekombinantní bakuloviry pro přípravu celkem 8 chimérických kandidátních vakcín odvozených od VLPs MPyV s různými imunogenními epitopy proteinu Cap PCV2 na jejich povrchu.
 - Byl připraven rekombinantní bakulovirus pro produkci chimerické kandidátní vakcíny ve formě VLPs MPyV s proteinem Cap fúzovaným s C-koncem zkráceného minoritního kapsidového proteinu VP3 (tVP3) MPyV. Toto uspořádání zajišťuje lokalizaci proteinu Cap PCV2 v dutině VLP. Příslušný univerzální konstrukt byl připraven v naší laboratoři již dříve.
 - Byl připraven rekombinantní bakulovirus pro produkci kandidátní vakcíny v podobě kapsomerní struktury sestávající z pentameru VP1 MPyV s navázaným proteinem Cap PCV2 na C – konci VP1.
 - Od všech výše zmíněných rekombinantních bakulovirů byly v hmyzích buňkách produkovány chimerické nanostruktury, purifikovány a jejich vlastnosti byly ověřeny pomocí molekulárně biochemických metod a metodou elektronové mikroskopie. Celkem sedm chimerických nanostruktur se ukázalo jako stabilních a vhodných pro další testování jako kandidátních vakcín.
- **Byly připraveny kandidátní vakcíny proti bovinnímu papilomaviru BPV-1.**
 - Byl připraven transferový vektor a rekombinantní bakulovirus pro produkci VLPs BPV-1 v hmyzích buňkách složených z hlavního strukturního proteinu L1.

- Na základě univerzálního vektoru pro přípravu chimérických kapsomerních struktur založených na VP1 MPyV byl připraven transferový vektor a rekombinantní bakulovirus pro produkci kapsomerní struktury složené z fúzního proteinu tvořeného epitopem odvozeným z N-koncové části proteinu L2 BPV-1 a MPyV VP1.
- U všechny stabilních rekombinantních nanostruktur byla prokázána schopnost vyvolat imunitní odpověď proti cílovým antigenům v myších Balb/C.
- Vybrané rekombinantní nanostruktury, které byly nejúspěšnější v imunologických testech na myších byly dále testovány na cílových zvířatech. Byla u nich prokázána schopnost vyvolat protilátkovou imunitní odpověď, včetně tvorby virus neutralizačních protilátek.
- Byla vypracována diagnostická metoda pro zjišťování hladiny protilátek proti PCV2 v krevních sérech prasat založená na formátu „Blocking“ ELISA
 - Tato metoda je nyní dále testována na velkých souborech prasečích sér, porovnávána s výsledky komerčních testů a testována na použití pro zjišťování hladiny virus neutralizačních protilátek v prasečích sérech.
- Byl podán návrh na patentovou ochranu vakcíny proti PCV2 a zaregistrovány dva užité vzory zajišťující právní ochranu pro antigeny, které jsou součástí kandidátních vakcín proti PCV2 a BPV-1.
- Kandidátní vakcíny proti BPV-1 (založená na L1 VLPs) a proti PCV2 (založená na kapsomerní struktuře VP1 MPyV) jsou nyní testovány ve výrobní fázi firmou Dyntec spol. s r.o.
- Byla prokázána interakce proteinu VP1 MPyV s mikrotubuly s důsledkem blokády buněčného cyklu v G2/M fázi.
- Bylo ukázáno, že výběr DNA pro enkapsidaci do virionů MPyV je spíše řízen její dostupností a lokální koncentrací než cis elementem přítomným na enkapsidované DNA.

8. Další odborné publikace, na kterých se autor podílel.

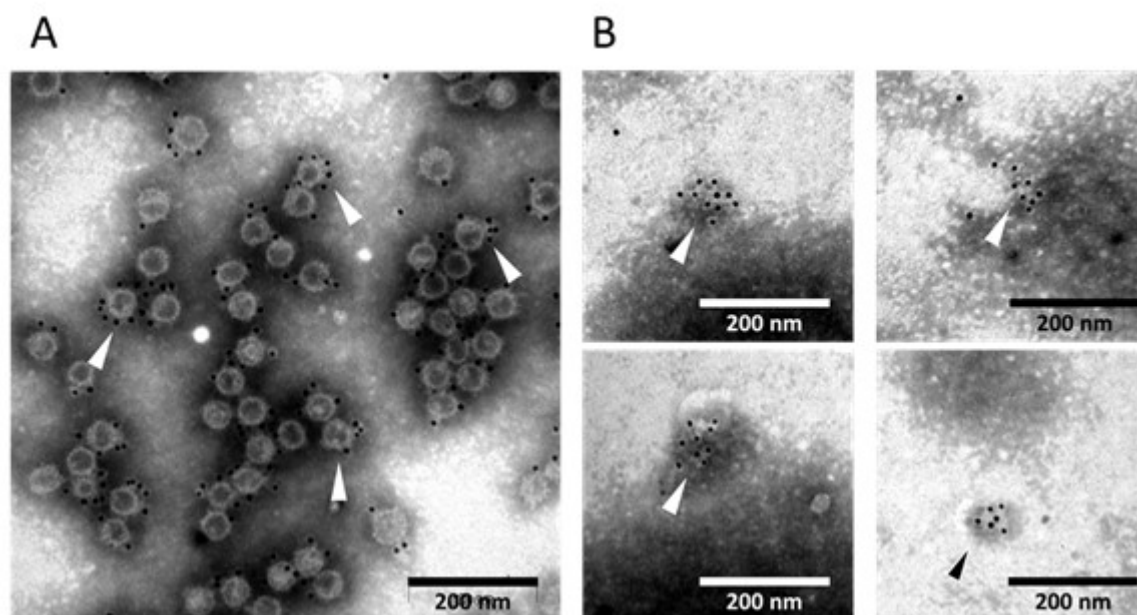
8.1 Seroprevalence polyomavirů BKV, JCV a MCPyV v populaci České republiky.

8.1.1 Překlad anglického abstraktu článku

Polyomaviry JC a BK (JCV a BKV) infikují člověka a mohou způsobovat závažná onemocnění u imunokompromitovaných pacientů. Polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV) může být pozorován v kožních nádorech. V této studii jsme zkoumali výskyt protilátek proti polyomavirům MCPyV, BKV a JCV v sérech zdravé populace České republiky. Vzorky sér od 991 zdravých jedinců (ve věkovém rozmezí 6-64 let) byly analyzovány pomocí ELISA testu pomocí viru podobných částic (VLPs) založených na hlavních kapsidových proteinech VP1 těchto virů. Celkově byly nalezeny protilátky proti MCPyV, JCV a BKV v pořadí 63 %, 57 % a 69 % sér této populace. Pro všechny testované viry byly tyto frekvence závislé na věku; přítomnost protilátek proti MCPyV a JCV byla nejvyšší u osob starších 59 let, zatímco přítomnost protilátek proti BKV byla nejvyšší u osob ve věku 10-19 let a 20-29 let. Tato práce je první velká studie, která zjišťovala seroprevalenci polyomavirů BKV, JCV a MCPyV v populaci České republiky.

8.1.2 Podíl autora

V této práci jsem se podílel na ověření kvality purifikace VLPs BKV, JCV a MCPyV, které byly následně používány jako antigen při vyšetřování lidských krevních sér na přítomnost protilátek proti výše zmíněným polyomavirům, a to pomocí elektronové mikroskopie, metodou negativního barvení. Součástí této práce bylo také vyšetřování kožních stěrů lidských pacientů na přítomnost MCPyV. Kožní stěry se odebíraly z oblasti čela, podpaží a ušních boltců. Přítomnost viru byla detekovaná metodou přímé imunoelektronové mikroskopie (DIEM) s detekcí hlavního kapsidového proteinu VP1 MCPyV. Bylo vyšetřeno celkem 20 pacientů, avšak pouze u jednoho z nich se podařilo detekovat přítomnost VP1 MCPyV metodou DIEM. Shluky detekovaného proteinu svým tvarem implikovaly rozpadlé částice viru, nicméně intaktní virovou částici se nalézt nepodařilo, viz obr 44. Z důvodu nejednoznačných výsledků a faktu, že se se VP1 MCPyV podařilo detekovat pouze ve stěrech jediného pacienta, nejsou tyto výsledky součástí finální publikace.



Obrázek 44: Detekce VP1 MCPyV metodou DIEM.

(A) – ověření specifity protilátky proti VP1 MCPyV na VLPs MCPyV.

(B) – kožní stěry pacientů vyšetřované na přítomnost viru MCPyV. Na fotografiích jsou patrné shluky proteinu VP1 MCPyV. Šípky označují značení VP1 MCPyV 5 nm zlatými částicemi.

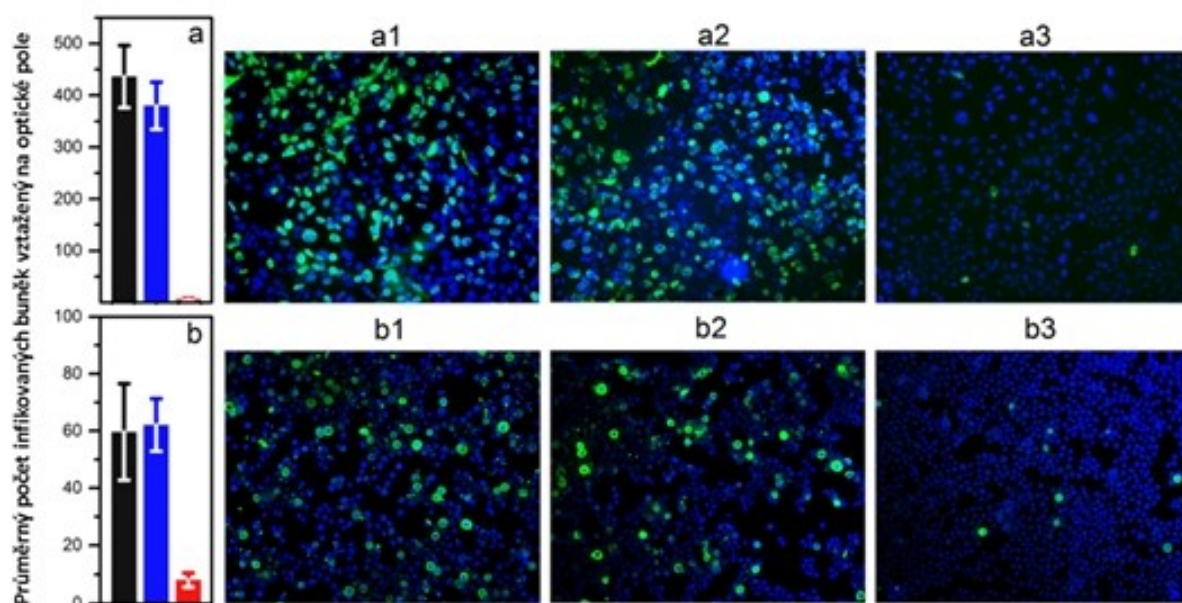
8.2 Antibakteriální, antivirové a na kyslík citlivé nanočástice připravené z elektrospřádaných materiálů.

8.2.1 Překlad anglického abstraktu

Použili jsme jednoduchou nanoprecipitační metodu pro přípravu stabilních fotoaktivních polystyrenových částic (NPs) o průměru 30 ± 10 nm, ze sulfonovaných membrán, které byly elektrostaticky zvlákněny do podoby polystyrenových nanovláken. Tyto nanovlákná uvnitř obsahují 5,10,15,20-tetrafenylporfyrin (TPP), nebo platinum oktaethylporfyrin (Pt-OEP). NPs obsahující TPP mají silné antibakteriální a antivirové účinky a mohou být použity k fotooxidaci povrchů založené na fotogenerovaném singletovém kyslíku. Na rozdíl od nanovláknových membrán, které mají pouze omezenou fotooxidační schopnost v blízkosti povrchů, NPs jsou schopny být v blízkém kontaktu s cílenou strukturou. NPs s Pt-OEP byly použity pro detekci kyslíku ve vodném roztoku. Pozorovali jsme silnou lineární odpověď na širokou škálu koncentrací kyslíku. Membrány z nanovláken mohou být použity nejen jako zdroj NPs ale i jako efektivní filtr pro jejich odstranění z roztoku.

8.2.1.1 Podíl autora

Prováděl jsem všechny pokusy týkající se testování antivirových účinků NPs. Jako model ze skupiny obalených virů byl zvolen rekombinantní bakulovirus produkující hlavní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru (MPyV). Ze skupiny neobalených virů byly antivirové účinky testovány na myším polyomaviru. Výsledky byly vyhodnoceny jako statistický rozdíl počtu infikovaných buněk v nepřítomnosti NPs, v přítomnosti NPs za nepřístupu světla a přítomnosti NPs ozářených viditelným světlem po dobu 30 minut. V případě infekce rekombinantním bakulovirem byly použity hmyzí buňky sf9, v případě myšího polyomaviru byly použity myší fibroblasty 3T6. Infikované buňky byly identifikovány na základě exprese VP1 MPyV metodou imunofluorescence. Výsledky viz. obr. 45



Obrázek 45: Antivirový účinek světlem aktivovaných NPs.

(a) infekce neobaleným MPyV.

(b) infekce obaleným rekombinantním bakulovirem produkujícím VP1 MPyV.

Sloupce grafů představují průměrné počty infikovaných buněk na jedno optické pole fluorescenčního mikroskopu se standardní odchylkou od tří nezávislých experimentů. Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu **a1-a3, b1-b3**.

Infekce bez přítomnosti NPs – černý sloupec (**a1, b1**), infekce v přítomnosti NPs bez přístupu světla – modrý sloupec (**a2, b2**), infekce v přítomnosti NPs ozařovaných viditelným světlem po dobu 30 minut – červený sloupec (**a3, b3**).

Buněčná jádra jsou barveny DAPI (modře) a infikované buňky jsou barveny protilátkami proti VP1 MPyV (zeleně).

8.3 Role jaderného aktinu a laminů při virové infekci.

8.3.1 Překlad anglického abstraktu

Laminy jsou nejlépe popsanou cytoskeletální složkou buněčného jádra, které pomáhají udržovat jaderný tvar a účastní se v různých jaderných procesech včetně replikace nebo transkripce. Jaderný aktin je dnes považován za další klíčovou složku cytoskeletu přítomnou v jádře, která plní důležité funkce v genové expresi. Některé viry replikující se v jádře vyvinuly schopnost interagovat a pravděpodobně využít jaderný aktin pro svou replikaci, například pro morfogenezi a transport jejich kapsid nebo export mRNA. Na druhou stranu laminy mohou hrát roli v pomnožení virů, i když jaderná lamina může představovat překážku pro viriony, které vstupují nebo vystupují z jádra. Tato publikace shrnuje současné poznání o rolích jaderného aktinu a laminů ve virové infekci.

9. Seznam použité literatury

- Abbing, A., Blaschke, U.K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, C.M.B., Thies, M.J.W., Walter, J., Weigand, M., Woith, D.C., Hess, J., Reiser, C.O.A., 2004. Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.* 279, 27410–27421. doi:10.1074/jbc.M313612200
- Acheson, N.H., 1978. Polyoma virus giant RNAs contain tandem repeats of the nucleotide sequence of the entire viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4754–4758.
- Aguilera, B.E., Chávez-Calvillo, G., Elizondo-Quiroga, D., Jimenez-García, M.N., Carrillo-Tripp, M., Silva-Rosales, L., Hernández-Gutiérrez, R., Gutiérrez-Ortega, A., 2017. Porcine circovirus type 2 protective epitope densely carried by chimeric papaya ringspot virus-like particles expressed in *Escherichia coli* as a cost-effective vaccine manufacture alternative. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64, 406–414. doi:10.1002/bab.1491
- Ali, L.M., Rizvi, T.A., Mustafa, F., 2016. Cross- and Co-Packaging of Retroviral RNAs and Their Consequences. *Viruses* 8. doi:10.3390/v8100276
- Allan, G.M., McNeilly, E., Kennedy, S., Meehan, B., Moffett, D., Malone, F., Ellis, J., Krakowka, S., 2000. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146, 711–712.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998. Isolation of Porcine Circovirus-like Viruses from Pigs with a Wasting Disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 3–10. doi:10.1177/104063879801000102
- Andreasson, K., Eriksson, M., Tegerstedt, K., Ramqvist, T., Dalianis, T., 2010. CD4+ and CD8+ T cells can act separately in tumour rejection after immunization with murine pneumotropic virus chimeric Her2/neu virus-like particles. *PLoS One* 5, e11580. doi:10.1371/journal.pone.0011580
- Ashrafi, G.H., Piuko, K., Burden, F., Yuan, Z., Gault, E.A., Müller, M., Trawford, A., Reid, S.W.J., Nasir, L., Campo, M.S., 2008. Vaccination of sarcoid-bearing donkeys with chimeric virus-like particles of bovine papillomavirus type 1. *J. Gen. Virol.* 89, 148–157. doi:10.1099/vir.0.83267-0
- Atkin, S.J.L., Griffin, B.E., Dilworth, S.M., 2009. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Semin. Cancer Biol.* 19, 211–217. doi:10.1016/j.semcancer.2009.03.001
- Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C., Brown, J.C., 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60, 1445–1456. doi:10.1016/S0006-3495(91)82181-6
- Barouch, D.H., Harrison, S.C., 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* 68, 3982–3989.
- Beach, N.M., Meng, X.-J., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res., Recent Advances in Porcine Circoviruses and Associated Diseases* 164, 33–42. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.041
- Belyaev, A.S., Roy, P., 1993. Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. *Nucleic Acids Res.* 21, 1219–1223.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S.E., Conner, M.E., Estes, M.K., 2003. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21, 3885–3900.
- Bickert, T., Wohlleben, G., Brinkman, M., Trujillo-Vargas, C.M., Ruehland, C., Reiser, C.O.A., Hess, J., Erb, K.J., 2007a. Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 196, 31–39. doi:10.1007/s00430-006-0026-x

- Bickert, T., Wohlleben, G., Brinkman, M., Trujillo-Vargas, C.M., Ruehland, C., Reiser, C.O.A., Hess, J., Erb, K.J., 2007b. Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 196, 31–39. doi:10.1007/s00430-006-0026-x
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., Garcea, R.L., 2008. Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J. Virol.* 82, 9848–9857. doi:10.1128/JVI.01221-08
- Bocaneti, F., Altamura, G., Corteggio, A., Velescu, E., Roperto, F., Borzacchiello, G., 2016. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 14–23. doi:10.1111/tbed.12222
- Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempey, J., Consigli, R.A., 1981. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 37, 80–91.
- Boni, S., Lavergne, J.-P., Boulant, S., Cahour, A., 2005. Hepatitis C virus core protein acts as a transmodulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J. Biol. Chem.* 280, 17737–17748. doi:10.1074/jbc.M501826200
- Boura, E., Liebl, D., Spísek, R., Fric, J., Marek, M., Stokrová, J., Holán, V., Forstová, J., 2005. Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett.* 579, 6549–6558. doi:10.1016/j.febslet.2005.10.062
- Brady, J.N., Winston, V.D., Consigli, R.A., 1977. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23, 717–724.
- Branco, L.M., Grove, J.N., Geske, F.J., Boisen, M.L., Muncy, I.J., Magliato, S.A., Henderson, L.A., Schoepp, R.J., Cashman, K.A., Hensley, L.E., Garry, R.F., 2010. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virol. J.* 7, 279. doi:10.1186/1743-422X-7-279
- Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J.T., Lowy, D.R., 1995. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* 69, 3959–3963.
- Bright, R.A., Carter, D.M., Daniluk, S., Toapanta, F.R., Ahmad, A., Gavrillo, V., Massare, M., Pushko, P., Mytle, N., Rowe, T., Smith, G., Ross, T.M., 2007. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25, 3871–3878. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.106
- Brinkman, M., Walter, J., Grein, S., Thies, M.J.W., Schulz, T.W., Herrmann, M., Reiser, C.O.A., Hess, J., 2005. Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 54, 611–622. doi:10.1007/s00262-004-0655-0
- Brinkman, M., Walter, J., Jennes, I., Neugebauer, M., Bertling, W., Grein, S., Thies, M., Weigand, M., Beyer, T., Herrmann, M., 2004. Recombinant Murine Polyoma Virus-like-particles Induce Protective Antitumour Immunity. *Lett. Drug Des. Discov.* 1, 137–147. doi:10.2174/1570180043485545
- Bucarey, S.A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Sáenz, L., Zuñiga, A., Tobar, J.A., 2009. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* 27, 5781–5790. doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.061
- Buch, M.H.C., Liaci, A.M., O'Hara, S.D., Garcea, R.L., Neu, U., Stehle, T., 2015. Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *PLoS Pathog.* 11, e1005104. doi:10.1371/journal.ppat.1005104
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *J. Virol.* 78, 751–757. doi:10.1128/JVI.78.2.751-757.2004

- Buck, C.B., Thompson, C.D., 2007. Production of papillomavirus-based gene transfer vectors. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 26, Unit 26.1. doi:10.1002/0471143030.cb2601s37
- Buck, C.B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E.M., Tisza, M.J., An, P., Katz, J.P., Pipas, J.M., McBride, A.A., Camus, A.C., McDermott, A.J., Dill, J.A., Delwart, E., Ng, T.F.F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D.V., Varsani, A., 2016. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 12, e1005574. doi:10.1371/journal.ppat.1005574
- Burton, K.S., Consigli, R.A., 1996. Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Res.* 40, 141–147.
- C, R., J, S., Ja, R.-V., Jm, F., Gm, R.-A., Co, D., M, B., J, P.-D., M, D., 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146, 40–43. doi:10.1136/vr.146.2.40
- Cadman, L., 2008. The future of cervical cancer prevention: human papillomavirus vaccines. *J. Fam. Health Care* 18, 131–132.
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R.A., 1994. Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J. Virol.* 68, 7609–7613.
- Campo, M.S., 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.* 89, 249–261. doi:10.1016/S0168-1702(02)00193-4
- Campo, M.S., Grindlay, G.J., O'Neil, B.W., Chandrachud, L.M., McGarvie, G.M., Jarrett, W.F.H., 1993. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J. Gen. Virol.* 74, 945–953. doi:10.1099/0022-1317-74-6-945
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M.-I., Eufemi, M., Amati, P., 2004. Chromosome-protein interactions in polyomavirus virions. *J. Virol.* 78, 513–519.
- Carmichael, G.G., 2016. Gene Regulation and Quality Control in Murine Polyomavirus Infection. *Viruses* 8. doi:10.3390/v8100284
- Carr, M., Gonzalez, G., Sasaki, M., Ito, K., Ishii, A., Hang'ombe, B.M., Mweene, A.S., Orba, Y., Sawa, H., 2017. Discovery of African bat polyomaviruses and infrequent recombination in the large T antigen in the Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 726–738. doi:10.1099/jgv.0.000737
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.-I., 2003. Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.* 77, 3913–3921.
- Cecchinato, M., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Clubbe, J., Battilani, M., Naylor, C.J., 2010. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Vet. Microbiol.* 146, 24–34. doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.014
- Chackerian, B., 2007. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 6, 381–390. doi:10.1586/14760584.6.3.381
- Chaiyakul, M., Hsu, K., Dardari, R., Marshall, F., Czub, M., 2010. Cytotoxicity of ORF3 Proteins from a Nonpathogenic and a Pathogenic Porcine Circovirus. *J. Virol.* 84, 11440–11447. doi:10.1128/JVI.01030-10
- Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A., 1993. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 67, 6327–6331.
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A., 1992. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191, 978–983.
- Chen, E.Y., Howley, P.M., Levinson, A.D., Seeburg, P.H., 1982. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 299, 529–534.
- Chen, L., Fluck, M., 2001. Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J. Virol.* 75, 8368–8379.
- Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C., 1998. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17, 3233–3240. doi:10.1093/emboj/17.12.3233

- Cheung, A.K., 2003a. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 313, 452–459. doi:10.1016/S0042-6822(03)00373-8
- Cheung, A.K., 2003b. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. *Virology* 310, 41–49. doi:10.1016/S0042-6822(03)00096-5
- Cheung, A.K., Greenlee, J.J., 2011. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res.* 155, 358–362. doi:10.1016/j.virusres.2010.09.021
- Chromy, L.R., Oltman, A., Estes, P.A., Garcea, R.L., 2006. Chaperone-mediated in vitro disassembly of polyoma- and papillomaviruses. *J. Virol.* 80, 5086–5091. doi:10.1128/JVI.80.10.5086-5091.2006
- Circella, E., Caroli, A., Marino, M., Legretto, M., Pugliese, N., Bozzo, G., Cocciolo, G., Dibari, D., Camarda, A., 2017. Polyomavirus Infection in Gouldian Finches (*Erythrura gouldiae*) and Other Pet Birds of the Family Estrildidae. *J. Comp. Pathol.* 156, 436–439. doi:10.1016/j.jcpa.2017.01.006
- Clark, B., Caparrós-Wanderley, W., Musselwhite, G., Kotecha, M., Griffin, B.E., 2001. Immunity against both polyomavirus VP1 and a transgene product induced following intranasal delivery of VP1 pseudocapsid-DNA complexes. *J. Gen. Virol.* 82, 2791–2797. doi:10.1099/0022-1317-82-11-2791
- Clark, E.G., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, 28th Annual Meeting*, pp.499–501.
- Conner, M.E., Zarley, C.D., Hu, B., Parsons, S., Drabinski, D., Greiner, S., Smith, R., Jiang, B., Corsaro, B., Barniak, V., Madore, H.P., Crawford, S., Estes, M.K., 1996. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* 174 Suppl 1, S88-92.
- Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segalés, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet. Microbiol.* 149, 522–523. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.009
- Crisci, E., Bárcena, J., Montoya, M., 2012. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 211–225. doi:10.1016/j.vetimm.2012.04.026
- Crowther, R.A., Berriman, J.A., Curran, W.L., Allan, G.M., Todd, D., 2003. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *J. Virol.* 77, 13036–13041. doi:10.1128/JVI.77.24.13036-13041.2003
- Dahl, J., You, J., Benjamin, T.L., 2005. Induction and utilization of an ATM signaling pathway by polyomavirus. *J. Virol.* 79, 13007–13017. doi:10.1128/JVI.79.20.13007-13017.2005
- Dailey, L., Basilico, C., 1985. Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J. Virol.* 54, 739–749.
- Dalton, J.A.R., Jackson, R.M., 2007. An evaluation of automated homology modelling methods at low target–template sequence similarity. *Bioinformatics* 23, 1901–1908. doi:10.1093/bioinformatics/btm262
- Darshan, M.S., Lucchi, J., Harding, E., Moroianu, J., 2004. The I2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J. Virol.* 78, 12179–12188. doi:10.1128/JVI.78.22.12179-12188.2004
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14252–14257. doi:10.1073/pnas.0404229101
- Dela Cruz, F.N., Li, L., Delwart, E., Pesavento, P.A., 2017. A novel pulmonary polyomavirus in alpacas (*Vicugna pacos*). *Vet. Microbiol.* 201, 49–55. doi:10.1016/j.vetmic.2017.01.005

- Deml, L., Speth, C., Dierich, M.P., Wolf, H., Wagner, R., 2005. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol. Immunol.* 42, 259–277. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.028
- Dietzschold, B., Gore, M., Marchadier, D., Niu, H.S., Bunschoten, H.M., Otvos, L., Wunner, W.H., Ertl, H.C., Osterhaus, A.D., Koprowski, H., 1990. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.* 64, 3804–3809.
- Dong, B., Feng, J., Lin, H., Li, L., Su, D., Tu, D., Zhu, W., Yang, Q., Ren, X., 2013. Immune responses of mice immunized by DNA plasmids encoding PCV2 ORF 2 gene, porcine IL-15 or the both. *Vaccine* 31, 5736–5744. doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.035
- Dorn, D.C., Lawatscheck, R., Zvirbliene, A., Aleksaite, E., Pecher, G., Sasnauskas, K., Ozel, M., Raftery, M., Schönrich, G., Ulrich, R.G., Gedvilaite, A., 2008. Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunol.* 21, 12–27. doi:10.1089/vim.2007.0085
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128, 56–64. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.016
- Eckhart, W., Hutchinson, M.A., Hunter, T., 1979. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18, 925–933.
- Ellis, J.A., Allan, G., Krakowka, S., 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1608–1614. doi:10.2460/ajvr.69.12.1608
- Fan, H., Ju, C., Tong, T., Huang, H., Lv, J., Chen, H., 2007. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet. Res. Commun.* 31, 487–496. doi:10.1007/s11259-007-3469-7
- Fan, H., Pan, Y., Fang, L., Wang, D., Wang, S., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S., 2008. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *J. Virol. Methods* 150, 21–26. doi:10.1016/j.jviromet.2008.02.011
- Fausch, S.C., Da Silva, D.M., Eiben, G.L., Le Poole, I.C., Kast, W.M., 2003. HPV protein/peptide vaccines: from animal models to clinical trials. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, s81–91.
- Ficek, R., Pšikal, I., Fictum, P., Bendová, J., Kosinová, E., Smítalová, R., Škorič, M., 2010. Exploratory Epidemiological Study on Porcine Circovirus Type 2 Infection and Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno* 79, 81–90. doi:10.2754/avb201079010081
- Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., Garcea, R.L., 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 77, 4818–4826.
- Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2009. Porcine circoviruses--small but powerful. *Virus Res.* 143, 177–183. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.009
- Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Doberstein, K., Rödner, C., Mankertz, A., 2009. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. *Virology* 386, 122–131. doi:10.1016/j.virol.2008.12.039
- Fitzsimons, D., François, G., Hall, A., McMahon, B., Meheus, A., Zanetti, A., Duval, B., Jilg, W., Böcher, W.O., Lu, S.-N., Akarca, U., Lavanchy, D., Goldstein, S., Banatvala, J., Damme, P.V., 2005. Long-term efficacy of hepatitis B vaccine, booster policy, and impact of hepatitis B virus mutants. *Vaccine* 23, 4158–4166. doi:10.1016/j.vaccine.2005.03.017
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B.E., 1995. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6, 297–306. doi:10.1089/hum.1995.6.3-297
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E., 1993. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67, 1405–1413.

- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet. Microbiol.* 125, 244–255. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.004
- Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., Castro, A.M.M.G.D., Biagini, P., Segalés, J., Drigo, M., 2015. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology* 12, 131. doi:10.1186/s12985-015-0361-x
- Fric, J., Marek, M., Hrusková, V., Holán, V., Forstová, J., 2008. Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* 26, 3242–3251. doi:10.1016/j.vaccine.2008.04.006
- Fu, F., Lang, Y., Li, X., Chai, Z., Tong, G., Liu, S., Tian, H., Li, H., Wang, W., Chen, X., Li, X., 2013a. Evaluation of the enhancing ability of three adjuvants for DNA vaccination using the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. *Virus Res.* 171, 247–251. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.029
- Fu, F., Tian, H., Li, X., Lang, Y., Tong, G., Liu, S., Li, H., Wang, W., Li, X., Chen, X., 2013b. C-terminal heat shock protein 70 of *Mycobacterium tuberculosis* as a molecular adjuvant for DNA vaccination with the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. *Vet. J.* 195, 244–247. doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.005
- Gamage, L.N.A., Ellis, J., Hayes, S., 2009. Immunogenicity of bacteriophage lambda particles displaying porcine Circovirus 2 (PCV2) capsid protein epitopes. *Vaccine* 27, 6595–6604. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.019
- Gambhira, R., Jagu, S., Karanam, B., Gravitt, P.E., Culp, T.D., Christensen, N.D., Roden, R.B.S., 2007. Protection of Rabbits against Challenge with Rabbit Papillomaviruses by Immunization with the N Terminus of Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Antigen L2. *J. Virol.* 81, 11585–11592. doi:10.1128/JVI.01577-07
- Gao, Z., Dong, Q., Jiang, Y., Opriessnig, T., Wang, J., Quan, Y., Yang, Z., 2014. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs in vitro. *Virus Res.* 183, 56–62. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.024
- Garcea, R.L., Ballmer-Hofer, K., Benjamin, T.L., 1985. Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J. Virol.* 54, 311–316.
- Garcia, M.I., Perez, M., Caruso, M., Sthandier, O., Ferreira, R., Cermola, M., Macchia, C., Amati, P., 2000. A mutation in the DE loop of the VP1 protein that prevents polyomavirus transcription and replication. *Virology* 272, 293–301. doi:10.1006/viro.2000.0351
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., Hulme, B., 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1253–1257.
- Garren, S.B., Kondaveeti, Y., Duff, M.O., Carmichael, G.G., 2015. Global Analysis of Mouse Polyomavirus Infection Reveals Dynamic Regulation of Viral and Host Gene Expression and Promiscuous Viral RNA Editing. *PLoS Pathog.* 11, e1005166. doi:10.1371/journal.ppat.1005166
- Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Ozel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich, R., 2000. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 273, 21–35. doi:10.1006/viro.2000.0392
- Gedvilaite, A., Zvirbliene, A., Staniulis, J., Sasnauskas, K., Krüger, D.H., Ulrich, R., 2004. Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. *Viral Immunol.* 17, 51–68. doi:10.1089/088282404322875458
- Genmei, L., Manlin, L., Ruiai, C., Hongliang, H., Dangshuai, P., 2011. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing ORF2 of PCV2 and porcine IFN gamma. *Vaccine* 29, 8677–8682. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.118
- Gerber, S., Lane, C., Brown, D.M., Lord, E., DiLorenzo, M., Clements, J.D., Rybicki, E., Williamson, A.L., Rose, R.C., 2001. Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens

- when coadministered with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *J. Virol.* 75, 4752–4760. doi:10.1128/JVI.75.10.4752-4760.2001
- Gheit, T., Dutta, S., Oliver, J., Robitaille, A., Hampras, S., Combes, J.-D., McKay-Chopin, S., Le Calvez-Kelm, F., Fenske, N., Cherpelis, B., Giuliano, A.R., Franceschi, S., McKay, J., Rollison, D.E., Tommasino, M., 2017. Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology* 506, 45–54. doi:10.1016/j.virol.2017.03.007
- Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Smiley, S.A., An, K., Consigli, R.A., 1997. Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* 71, 2857–2865.
- Gleiter, S., Lilie, H., 2001. Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 10, 434–444. doi:10.1110/ps.31101
- Gleiter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H., 1999. Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 2562–2569. doi:10.1110/ps.8.12.2562
- Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebisch, S., Jentsch, K.D., Kaup, F.J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T., Lüke, W., 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* 73, 4465–4469.
- Gordon-Shaag, A., Ben-Nun-Shaul, O., Roitman, V., Yosef, Y., Oppenheim, A., 2002. Cellular Transcription Factor Sp1 Recruits Simian Virus 40 Capsid Proteins to the Viral Packaging Signal, *ses. J. Virol.* 76, 5915–5924. doi:10.1128/JVI.76.12.5915-5924.2002
- Graffi, A., Schramm, T., Bender, E., Bierwolf, D., Graffi, I., 1967. [On a new virus containing skin tumor in golden hamster]. *Arch. Geschwulstforsch.* 30, 277–283.
- Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 187, 23–32. doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.018
- Greenstone, H.L., Nieland, J.D., de Visser, K.E., De Bruijn, M.L., Kirnbauer, R., Roden, R.B., Lowy, D.R., Kast, W.M., Schiller, J.T., 1998. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1800–1805.
- Grgacic, E.V.L., Anderson, D.A., 2006. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods, Particle-based Vaccines* 40, 60–65. doi:10.1016/j.ymeth.2006.07.018
- Gross, L., 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 83, 414–421.
- Gu, J., Cao, R., Zhang, Y., Lian, X., Ishag, H., Chen, P., 2012. Deletion of the single putative N-glycosylation site of the porcine circovirus type 2 Cap protein enhances specific immune responses by DNA immunisation in mice. *Vet. J.* 192, 385–389. doi:10.1016/j.tvjl.2011.08.005
- Guo, L., Lu, Y., Huang, L., Wei, Y., Liu, C., 2011. Identification of a New Antigen Epitope in the Nuclear Localization Signal Region of Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein. *Intervirology* 54, 156–163. doi:10.1159/000319838
- Guo, L.J., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Huang, L.P., Liu, C.M., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol. J.* 7, 273. doi:10.1186/1743-422X-7-273
- Guo, Y.-H., Li, Y.-N., Zhao, J.-R., Zhang, J., Yan, Z., 2011. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 6, 720–726. doi:10.4161/epi.6.6.15815
- Hainisch, E.K., Brandt, S., Shafti-Keramat, S., Van Den Hoven, R., Kirnbauer, R., 2012. Safety and immunogenicity of BPV-1 L1 virus-like particles in a dose-escalation vaccination trial in horses. *Equine Vet. J.* 44, 107–111. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00390.x
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *J. Virol.* 72, 5262–5267.

- Hayes, S., Gamage, L.N.A., Hayes, C., 2010. Dual expression system for assembling phage lambda display particle (LDP) vaccine to porcine Circovirus 2 (PCV2). *Vaccine* 28, 6789–6799. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.047
- Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L., Shenk, T., 1987. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.* 61, 2555–2558.
- Heidari, S., Vlastos, A., Ramqvist, T., Clark, B., Griffin, B.E., Garcia, M.I., Perez, M., Amati, P., Dalianis, T., 2002. Immunization of T-cell deficient mice against polyomavirus infection using viral pseudocapsids or temperature sensitive mutants. *Vaccine* 20, 1571–1578.
- Hellner, K., Dorrell, L., 2017. Recent advances in understanding and preventing human papillomavirus-related disease. *F1000Research* 6. doi:10.12688/f1000research.9701.1
- Holländerová, D., Raslová, H., Blangy, D., Forstová, J., Berebbi, M., 2003. Interference of mouse polyomavirus with the c-myc gene and its product in mouse mammary adenocarcinomas. *Int. J. Oncol.* 23, 333–341.
- Horníková, L., Man, P., Forstová, J., 2011. Blue native protein electrophoresis for studies of mouse polyomavirus morphogenesis and interactions between the major capsid protein VP1 and cellular proteins. *J. Virol. Methods* 178, 229–234. doi:10.1016/j.jviromet.2011.08.019
- Hrusková, V., Morávková, A., Babiarová, K., Ludvíková, V., Fric, J., Vonka, V., Forstová, J., 2009. Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int. J. Oncol.* 35, 1247–1256.
- Hu, J., Liu, K., 2017. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses* 9. doi:10.3390/v9030056
- Hu, Y.-M., Huang, S.-J., Chu, K., Wu, T., Wang, Z.-Z., Yang, C.-L., Cai, J.-P., Jiang, H.-M., Wang, Y.-J., Guo, M., Liu, X.-H., Huang, H.-J., Zhu, F.-C., Zhang, J., Xia, N.-S., 2014. Safety of an Escherichia coli-expressed bivalent human papillomavirus (types 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine: an open-label phase I clinical trial. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 469–475. doi:10.4161/hv.26846
- Huang, L., Lu, Y., Wei, Y., Guo, L., Liu, C., 2011. Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2. *J. Virol. Methods* 171, 26–33. doi:10.1016/j.jviromet.2010.09.023
- Huang, L.P., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Guo, L.J., Liu, C.M., 2011. Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiol.* 11, 188. doi:10.1186/1471-2180-11-188
- Huang, X., Wang, X., Zhang, J., Xia, N., Zhao, Q., 2017. Escherichia coli- derived virus-like particles in vaccine development. *Npj Vaccines* 2, 3. doi:10.1038/s41541-017-0006-8
- Huérffano, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., Forstová, J., 2017. Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS J.* 284, 883–902. doi:10.1111/febs.14033
- Huerfano, S., Zíla, V., Boura, E., Španielová, H., Stokrová, J., Forstová, J., 2010. Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS J.* 277, 1270–1283. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07558.x
- Ishii, N., Nakanishi, A., Yamada, M., Macalalad, M.H., Kasamatsu, H., 1994. Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins. *J. Virol.* 68, 8209–8216.
- Jagu, S., Malandro, N., Kwak, K., Yuan, H., Schlegel, R., Palmer, K.E., Huh, W.K., Campo, M.S., Roden, R.B.S., 2011. A multimeric L2 vaccine for prevention of animal papillomavirus infections. *Virology* 420, 43–50. doi:10.1016/j.virol.2011.07.020
- Jarrett, W.F.H., Smith, K.T., O’Neil, B.W., Gaukroger, J.M., Chandrachud, L.M., Grindlay, G.J., McGarvie, G.M., Campo, M.S., 1991. Studies on vaccination against papillomaviruses: Prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology* 184, 33–42. doi:10.1016/0042-6822(91)90819-W

- Jennings, G.T., Bachmann, M.F., 2008. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.* 389, 521–536. doi:10.1515/BC.2008.064
- Jeong, S.-H., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Reherrmann, B., Murthy, K., Liang, T.J., 2004. Immunization with Hepatitis C Virus-Like Particles Induces Humoral and Cellular Immune Responses in Nonhuman Primates. *J. Virol.* 78, 6995–7003. doi:10.1128/JVI.78.13.6995-7003.2004
- Jesus, A.L.S., Mariz, F.C., Souza, H.M., Cordeiro, M.N., Coimbra, E.C., Leitão, M.C.G., Nascimento, L.M., Stocco, R.C., Beçak, W., Freitas, A.C., 2012. Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet. Mol. Res. GMR* 11, 2598–2607. doi:10.4238/2012.July.19.2
- Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B., Chen, H., 2005. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1–ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 109, 179–190. doi:10.1016/j.vetmic.2005.06.001
- Kam, Y.-W., Lum, F.-M., Teo, T.-H., Lee, W.W.L., Simarmata, D., Harjanto, S., Chua, C.-L., Chan, Y.-F., Wee, J.-K., Chow, A., Lin, R.T.P., Leo, Y.-S., Grand, R.L., Sam, I.-C., Tong, J.-C., Roques, P., Wiesmüller, K.-H., Rénia, L., Röttschke, O., Ng, L.F.P., 2012. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol. Med.* 4, 330–343. doi:10.1002/emmm.201200213
- Kämper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.-C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J.T., Sapp, M., 2006. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J. Virol.* 80, 759–768. doi:10.1128/JVI.80.2.759-768.2006
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjær-Mikkelsen, A.-S., Bøtner, A., 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22, 1358–1361. doi:10.1016/j.vaccine.2004.01.032
- Karanam, B., Jagu, S., Huh, W.K., Roden, R.B.S., 2009. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol. Cell Biol.* 87, 287–299. doi:10.1038/icb.2009.13
- Karuppannan, A.K., Kwang, J., 2011. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus. *Virology* 410, 248–256. doi:10.1016/j.virol.2010.11.009
- Kawano, M., Morikawa, K., Suda, T., Ohno, N., Matsushita, S., Akatsuka, T., Handa, H., Matsui, M., 2014. Chimeric SV40 virus-like particles induce specific cytotoxicity and protective immunity against influenza A virus without the need of adjuvants. *Virology* 448, 159–167. doi:10.1016/j.virol.2013.10.010
- Kekarainen, T., Gonzalez, A., Llorens, A., Segalés, J., 2014. Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms. *J. Gen. Virol.* 95, 1734–1742. doi:10.1099/vir.0.065318-0
- Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segalés, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 185–193. doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.025
- Kekarainen, T., Montoya, M., Dominguez, J., Mateu, E., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 41–49. doi:10.1016/j.vetimm.2008.01.031
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122, 9–24. doi:10.1053/jcpa.1999.0337
- Khayat, R., Brunn, N., Speir, J.A., Hardham, J.M., Ankenbauer, R.G., Schneemann, A., Johnson, J.E., 2011. The 2.3-Angstrom Structure of Porcine Circovirus 2. *J. Virol.* 85, 7856–7862. doi:10.1128/JVI.00737-11
- Kim, Y., Kim, J., Kang, K., Lyoo, Y.S., 2002. Characterization of the recombinant proteins of porcine circovirus type2 field isolate expressed in the baculovirus system. *J. Vet. Sci.* 3, 19–23.

- Kimchi-Sarfaty, C., Gottesman, M.M., 2004. SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer and their potential application in cancer therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 451–458.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 12180–12184.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L.M., O’Neil, B.W., Wagner, E.R., Grindlay, G.J., Armstrong, A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Campo, M.S., 1996. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219, 37–44. doi:10.1006/viro.1996.0220
- Kixmüller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmüller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26, 3443–3451. doi:10.1016/j.vaccine.2008.04.032
- Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., Kanda, T., 2007. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* 358, 266–272. doi:10.1016/j.virol.2006.08.037
- Krakowka, S., Allan, G., Ellis, J., Hamberg, A., Charreyre, C., Kaufmann, E., Brooks, C., Meehan, B., 2012. A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence. *Virus Res.* 164, 90–99. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.027
- Krauzewicz, N., Cox, C., Soeda, E., Clark, B., Rayner, S., Griffin, B.E., 2000a. Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 1094–1102. doi:10.1038/sj.gt.3301219
- Krauzewicz, N., Griffin, B.E., 2002. Polyoma and Papilloma Virus Vectors For Cancer Gene Therapy, in: Habib, N.A. (Ed.), *Cancer Gene Therapy, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, pp. 73–82. doi:10.1007/0-306-46817-4_8
- Krauzewicz, N., Stokrová, J., Jenkins, C., Elliott, M., Higgins, C.F., Griffin, B.E., 2000b. Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 2122–2131. doi:10.1038/sj.gt.3301322
- Krauzewicz, N., Streuli, C.H., Stuart-Smith, N., Jones, M.D., Wallace, S., Griffin, B.E., 1990. Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J. Virol.* 64, 4414–4420.
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q., 2017. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 703–708. doi:10.1111/tbed.12638
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lawatscheck, R., Aleksaite, E., Schenk, J.A., Micheel, B., Jandrig, B., Holland, G., Sasnauskas, K., Gedvilaite, A., Ulrich, R.G., 2007. Chimeric Polyomavirus-Derived Virus-Like Particles: The Immunogenicity of an Inserted Peptide Applied without Adjuvant to Mice Depends on Its Insertion Site and Its Flanking Linker Sequence. *Viral Immunol.* 20, 453–460. doi:10.1089/vim.2007.0023
- Lechmann, M., Murata, K., Sato, J., Vergalla, J., Baumert, T.F., Liang, T.J., 2001. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 34, 417–423. doi:10.1053/jhep.2001.26523
- Lefebvre, D.J., Costers, S., Van Doorselaere, J., Misinzo, G., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 89, 177–187. doi:10.1099/vir.0.83280-0
- Lehman, J.M., Laffin, J., Friedrich, T.D., 1994. DNA content distribution of mouse cells following infection with polyoma virus. *Cytometry* 16, 138–143. doi:10.1002/cyto.990160207

- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumniyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X.J., 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78, 8135–8145. doi:10.1128/JVI.78.15.8135-8145.2004
- Lenz, P., Day, P.M., Pang, Y.Y., Frye, S.A., Jensen, P.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2001. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5346–5355.
- Li, D.L., Huang, Y., Chang, L.L., Du, Q., Chen, Y., Wang, T.T., Luo, X.M., Zhao, X.M., Tong, D.W., 2016. Modified recombinant adenoviruses increase porcine circovirus 2 capsid protein expression and induce enhanced immune responses in mice. *Acta Virol.* 60, 271–280.
- Li, M., Garcea, R.L., 1994. Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J. Virol.* 68, 320–327.
- Li, M., Lyon, M.K., Garcea, R.L., 1995. In vitro phosphorylation of the polyomavirus major capsid protein VP1 on serine 66 by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 270, 26006–26011.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C., 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354, 278–284. doi:10.1038/354278a0
- Lima, E.G., Lira, R.C., Jesus, A.L.S., Dhalia, R., Freitas, A.C., 2014. Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene. *Genet. Mol. Res. GMR* 13, 1121–1126. doi:10.4238/2014.February.20.13
- Lin, H., Ma, Z., Fan, H., Lu, C., 2012. Construction and immunogenicity of recombinant swinepox virus expressing capsid protein of PCV2. *Vaccine* 30, 6307–6313. doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.082
- Lin, H., Ma, Z., Yang, X., Fan, H., Lu, C., 2014. A novel vaccine against Porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ) co-infection. *Vet. Microbiol.* 171, 198–205. doi:10.1016/j.vetmic.2014.03.018
- Linzer, D.I., Levine, A.J., 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.
- Liu, F., Ge, S., Li, L., Wu, X., Liu, Z., Wang, Z., 2012. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Res. Vet. Sci.* 93, 553–559. doi:10.1016/j.rvsc.2011.10.018
- Liu, F., Wu, X., Li, L., Ge, S., Liu, Z., Wang, Z., 2013. Virus-like particles: Promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 343–352. doi:10.1016/j.cimid.2013.02.002
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis In Vivo. *J. Virol.* 80, 5065–5073. doi:10.1128/JVI.80.10.5065-5073.2006
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a Previously Unidentified Viral Protein in Porcine Circovirus Type 2-Infected Cells and Its Role in Virus-Induced Apoptosis. *J. Virol.* 79, 8262–8274. doi:10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005
- Liu, J., Huang, L., Wei, Y., Tang, Q., Liu, D., Wang, Y., Li, S., Guo, L., Wu, H., Liu, C., 2013. Amino acid mutations in the capsid protein produce novel porcine circovirus type 2 neutralizing epitopes. *Vet. Microbiol.* 165, 260–267. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.013
- Liu, J., Zhu, Y., Chen, I., Lau, J., He, F., Lau, A., Wang, Z., Karuppannan, A.K., Kwang, J., 2007. The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 Interacts with Porcine Ubiquitin E3 Ligase Pirh2 and Facilitates p53 Expression in Viral Infection. *J. Virol.* 81, 9560–9567. doi:10.1128/JVI.00681-07
- Liu, L.-J., Suzuki, T., Tsunemitsu, H., Kataoka, M., Ngata, N., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., Li, T.-C., 2008. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch. Virol.* 153, 2291–2295. doi:10.1007/s00705-008-0248-x
- Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285, 91–99. doi:10.1006/viro.2001.0922

- Liu, Q., Willson, P., Atttoh-Poku, S., Babiuk, L.A., 2001. Bacterial Expression of an Immunologically Reactive PCV2 ORF2 Fusion Protein. *Protein Expr. Purif.* 21, 115–120. doi:10.1006/prep.2000.1356
- Liu, W.J., Gissmann, L., Sun, X.Y., Kanjanahaluethai, A., Müller, M., Doorbar, J., Zhou, J., 1997. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology* 227, 474–483. doi:10.1006/viro.1996.8348
- Love, A.J., Chapman, S.N., Matic, S., Noris, E., Lomonossoff, G.P., Taliany, M., 2012. In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* 236, 1305–1313. doi:10.1007/s00425-012-1692-0
- Lunardi, M., Alfieri, A.A., Arellano-Otonel, R.A., Alfieri, A.F., 2013a. Bovine Papillomaviruses — Taxonomy and Genetic Features. doi:10.5772/56195
- Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A., de Alcântara, B.K., Rodrigues, W.B., de Miranda, A.B., Alfieri, A.F., 2013b. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* 162, 207–213. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.030
- Lv, Q., Guo, K., Zhang, G., Zhang, Y., 2016. The ORF4 protein of porcine circovirus type 2 antagonizes apoptosis by stabilizing the concentration of ferritin heavy chain through physical interaction. *J. Gen. Virol.* 97, 1636–1646. doi:10.1099/jgv.0.000472
- Lv, Q., Guo, K., Zhang, Y., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes* 49, 1–10. doi:10.1007/s11262-014-1099-z
- Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., Albina, E., Jestin, A., 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 63, 223–233. doi:10.1016/S0301-6226(99)00138-4
- Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A., 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81, 1815–1824. doi:10.1099/0022-1317-81-7-1815
- Mandrioli, L., Sarli, G., Panarese, S., Baldoni, S., Marcato, P.S., 2004. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 97, 25–37. doi:10.1016/j.vetimm.2003.08.017
- Mankertz, A., Mueller, B., Steinfeldt, T., Schmitt, C., Finsterbusch, T., 2003. New Reporter Gene-Based Replication Assay Reveals Exchangeability of Replication Factors of Porcine Circovirus Types 1 and 2. *J. Virol.* 77, 9885–9893. doi:10.1128/JVI.77.18.9885-9893.2003
- Mannová, P., Forstová, J., 2003. Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol.* 77, 1672–1681.
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Stokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E., Forstová, J., 2002. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 83, 2309–2319. doi:10.1099/0022-1317-83-9-2309
- Marcekova, Z., Psikal, I., Kosinova, E., Benada, O., Sebo, P., Bumba, L., 2009. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *J. Virol. Methods* 162, 133–141. doi:10.1016/j.jviromet.2009.07.028
- Maree, S., Durbach, S., Huismans, H., 1998. Intracellular production of African horsesickness virus core-like particles by expression of the two major core proteins, VP3 and VP7, in insect cells. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 2), 333–337. doi:10.1099/0022-1317-79-2-333
- Martin, D.P., Biagini, P., Lefeuvre, P., Golden, M., Roumagnac, P., Varsani, A., 2011. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. *Viruses* 3, 1699–1738. doi:10.3390/v3091699
- Martínez, C., Dalsgaard, K., López de Turiso, J.A., Cortés, E., Vela, C., Casal, J.I., 1992. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* 10, 684–690.
- McBurney, S.P., Young, K.R., Ross, T.M., 2007. Membrane embedded HIV-1 envelope on the surface of a virus-like particle elicits broader immune responses than soluble envelopes. *Virology* 358, 334–346. doi:10.1016/j.virol.2006.08.032

- McGarvie, G.M., Joan Grindlay, G., Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Jarrett, W.F.H., Saveria Campo, M., 1995. T cell responses to BPV-4 E7 during infection and mapping of T cell epitopes. *Virology* 206, 504–510. doi:10.1016/S0042-6822(95)80066-2
- McGrath, M., de Villiers, G.K., Shephard, E., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P., 2013. Development of human papillomavirus chimaeric L1/L2 candidate vaccines. *Arch. Virol.* 158, 2079–2088. doi:10.1007/s00705-013-1713-8
- McKeown, N.E., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet. Microbiol.* 104, 113–117. doi:10.1016/j.vetmic.2004.08.013
- McNeil, C., 2006. Who invented the VLP cervical cancer vaccines? *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 433. doi:10.1093/jnci/djj144
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9), 2171–2179. doi:10.1099/0022-1317-79-9-2171
- Meerts, P., Gucht, S.V., Cox, E., Vandebosch, A., Nauwynck, H. j., 2005a. Correlation Between Type of Adaptive Immune Response Against Porcine Circovirus Type 2 and Level of Virus Replication. *Viral Immunol.* 18, 333–341. doi:10.1089/vim.2005.18.333
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Bøtner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet. Res.* 2, 6. doi:10.1186/1746-6148-2-6
- Meerts, P., Misinzo, G., McNeilly, F., Nauwynck, H.J., 2005b. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch. Virol.* 150, 427–441. doi:10.1007/s00705-004-0444-2
- Meireles, L.C., Marinho, R.T., Van Damme, P., 2015. Three decades of hepatitis B control with vaccination. *World J. Hepatol.* 7, 2127–2132. doi:10.4254/wjh.v7.i18.2127
- Meng, X.-J., 2013. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 43–64. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103720
- Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., Nauwynck, H.J., 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* 86, 2057–2068. doi:10.1099/vir.0.80652-0
- Módolo, D.G., Araldi, R.P., Mazzuchelli-de-Souza, J., Pereira, A., Pimenta, D.C., Zanphorlin, L.M., Beçak, W., Menossi, M., de Cassia Stocco, R., de Carvalho, R.F., 2017. Integrated analysis of recombinant BPV-1 L1 protein for the production of a bovine papillomavirus VLP vaccine. *Vaccine* 35, 1590–1593. doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.007
- Mohana Subramanian, B., Madhanmohan, M., Sriraman, R., Chandrasekhar Reddy, R.V., Yuvaraj, S., Manikumar, K., Rajalakshmi, S., Nagendrakumar, S.B., Rana, S.K., Srinivasan, V.A., 2012. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. *Antiviral Res.* 96, 288–295. doi:10.1016/j.antiviral.2012.09.019
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L., Garcea, R.L., 1991. Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 4991–4998.
- Moreland, R.B., Garcea, R.L., 1991. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185, 513–518.
- Morrow, W.J.W., Sheikh, N.A., Schmidt, C.S., Davies, D.H., 2012. *Vaccinology: Principles and Practice*. John Wiley & Sons.
- Munday, J.S., Thomson, N., Dunowska, M., Knight, C.G., Laurie, R.E., Hills, S., 2015. Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. *Vet. Microbiol.* 177, 289–295. doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.019

- Nakanishi, A., Li, P.P., Qu, Q., Jafri, Q.H., Kasamatsu, H., 2007. Molecular dissection of nuclear entry-competent SV40 during infection. *Virus Res.* 124, 226–230. doi:10.1016/j.virusres.2006.10.001
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81, 2281–2287. doi:10.1099/0022-1317-81-9-2281
- Neugebauer, M., Walders, B., Brinkman, M., Ruehland, C., Schumacher, T., Bertling, W.M., Geuther, E., Reiser, C.O.A., Reichel, C., Strich, S., Hess, J., 2006. Development of a vaccine marker technology: display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsoids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. *Biotechnol. J.* 1, 1435–1446. doi:10.1002/biot.200600149
- Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1997. A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 92–97. doi:10.1006/bbrc.1997.7765
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shirasawa, H., 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J. Gen. Virol.* 88, 1934–1938. doi:10.1099/vir.0.82794-0
- Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185. doi:10.1016/j.virol.2006.07.047
- Oppenheim, A., Sandalon, Z., Peleg, A., Shaul, O., Nicolis, S., Ottolenghi, S., 1992. A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *J. Virol.* 66, 5320–5328.
- Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Matzinger, S.R., Meng, X.-J., 2014a. Commercial PCV2a-based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b-infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2. *Vaccine* 32, 4342–4348. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.004
- Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.-T., Mogler, M., Halbur, P.G., 2014b. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 U.S. variant mPCV2b strain. *Vaccine* 32, 230–237. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.010
- Opriessnig, T., Madson, D.M., Prickett, J.R., Kuhar, D., Lunney, J.K., Elsener, J., Halbur, P.G., 2008a. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet. Microbiol.* 131, 103–114. doi:10.1016/j.vetmic.2008.03.002
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008b. Influence of Maternal Antibodies on Efficacy of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccination To Protect Pigs from Experimental Infection with PCV2. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 397–401. doi:10.1128/CVI.00416-07
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.-J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624–640. doi:10.1354/vp.41-6-624
- Ou, W.C., Wang, M., Fung, C.Y., Tsai, R.T., Chao, P.C., Hseu, T.H., Chang, D., 1999. The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J. Gen. Virol.* 80, 39–46. doi:10.1099/0022-1317-80-1-39
- Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H., 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1257–1260.
- Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M., 2017. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J. Virol.* 91. doi:10.1128/JVI.01879-16

- Palková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Stokrová, J., Forstová, J., 2000a. Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Lett.* 478, 281–289.
- Palková, Z., Spanielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, P., 2000b. The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Lett.* 467, 359–364.
- Palomares, L.A., Ramírez, O.T., 2009. Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. *Biochem. Eng. J.* 45, 158–167. doi:10.1016/j.bej.2009.02.006
- Pan, Q., He, K., Huang, K., 2008. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. *Vaccine* 26, 2119–2126. doi:10.1016/j.vaccine.2008.02.037
- Pastrana, D.V., Buck, C.B., Pang, Y.-Y.S., Thompson, C.D., Castle, P.E., FitzGerald, P.C., Krüger Kjaer, S., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* 321, 205–216. doi:10.1016/j.virol.2003.12.027
- Pastrana, D.V., Gambhira, R., Buck, C.B., Pang, Y.-Y.S., Thompson, C.D., Culp, T.D., Christensen, N.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Roden, R.B.S., 2005. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology* 337, 365–372. doi:10.1016/j.virol.2005.04.011
- Peretti, A., FitzGerald, P.C., Bliskovsky, V., Pastrana, D.V., Buck, C.B., 2015. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropristis striata*) Polyomavirus 1. *Genome Announc.* 3. doi:10.1128/genomeA.01476-14
- Perrone, L.A., Ahmad, A., Veguilla, V., Lu, X., Smith, G., Katz, J.M., Pushko, P., Tumpey, T.M., 2009. Intranasal vaccination with 1918 influenza virus-like particles protects mice and ferrets from lethal 1918 and H5N1 influenza virus challenge. *J. Virol.* 83, 5726–5734. doi:10.1128/JVI.00207-09
- Pineo, C.B., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P., 2013. Immunogenic assessment of plant-produced human papillomavirus type 16 L1/L2 chimaeras. *Plant Biotechnol. J.* 11, 964–975. doi:10.1111/pbi.12089
- Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.-J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Sorden, S.D., 2000. Characterization of Immune Response of Young Pigs to Porcine Circovirus Type 2 Infection. *Viral Immunol.* 13, 143–153. doi:10.1089/vim.2000.13.143
- Pores Fernando, A.T., Andrabi, S., Cizmecioglu, O., Zhu, C., Livingston, D.M., Higgins, J.M.G., Schaffhausen, B.S., Roberts, T.M., 2015. Polyoma small T antigen triggers cell death via mitotic catastrophe. *Oncogene* 34, 2483–2492. doi:10.1038/nc.2014.192
- Pushko, P., Pumpens, P., Grens, E., 2013. Development of Virus-Like Particle Technology from Small Highly Symmetric to Large Complex Virus-Like Particle Structures. *Intervirology* 56, 141–165. doi:10.1159/000346773
- Pushko, P., Tumpey, T.M., Van Hoeven, N., Belser, J.A., Robinson, R., Nathan, M., Smith, G., Wright, D.C., Bright, R.A., 2007. Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza. *Vaccine* 25, 4283–4290. doi:10.1016/j.vaccine.2007.02.059
- Pyeon, D., Pearce, S.M., Lank, S.M., Ahlquist, P., Lambert, P.F., 2009. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 5, e1000318. doi:10.1371/journal.ppat.1000318
- Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B., Tsai, B., 2007. A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J. Virol.* 81, 12996–13004. doi:10.1128/JVI.01037-07
- Read A. F. & Mackinnon M. J. Pathogen evolution in a vaccinated world. *Evol. Heal. Dis.* 2, 139–152 (2008).

- Rector, A., Van Ranst, M., 2013. Animal papillomaviruses. *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme 445, 213–223. doi:10.1016/j.virol.2013.05.007
- Ren, L., Chen, X., Ouyang, H., 2016. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. *Virus Genes* 52, 437–444. doi:10.1007/s11262-016-1326-x
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Day, P.M., 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1522–1527. doi:10.1073/pnas.0508815103
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J., 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* 75, 10880–10891. doi:10.1128/JVI.75.22.10880-10891.2001
- Riley, M.I., Yoo, W., Mda, N.Y., Folk, W.R., 1997. Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J. Virol.* 71, 6068–6074.
- Roden, R.B., Yutzy, W.H., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2000. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 270, 254–257. doi:10.1006/viro.2000.0272
- Roitman-Shemer, V., Stokrova, J., Forstova, J., Oppenheim, A., 2007. Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 424–430. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.038
- Rose, R.C., Lane, C., Wilson, S., Suzich, J.A., Rybicki, E., Williamson, A.L., 1999. Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine* 17, 2129–2135.
- Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76, 3232–3239.
- Rudolf, M.P., Man, S., Melief, C.J., Sette, A., Kast, W.M., 2001. Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 788s–795s.
- Rueda, P., Fominaya, J., Langeveld, J.P.M., Bruschke, C., Vela, C., Casal, J.I., 2000. Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine* 19, 726–734. doi:10.1016/S0264-410X(00)00259-0
- Saha, D., Lefebvre, D.J., Ooms, K., Huang, L., Delputte, P.L., Van Doorselaere, J., Nauwynck, H.J., 2012. Single amino acid mutations in the capsid switch the neutralization phenotype of porcine circovirus 2. *J. Gen. Virol.* 93, 1548–1555. doi:10.1099/vir.0.042085-0
- Sailaja, G., Skountzou, I., Quan, F.-S., Compans, R.W., Kang, S.-M., 2007. Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology* 362, 331–341. doi:10.1016/j.virol.2006.12.014
- Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L., 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895–904.
- Sapp, M., Volpers, C., Müller, M., Streeck, R.E., 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 9), 2407–2412. doi:10.1099/0022-1317-76-9-2407
- Schellenbacher, C., Roden, R.B.S., Kirnbauer, R., 2017. Developments in L2-based human papillomavirus (HPV) vaccines. *Virus Res.* 231, 166–175. doi:10.1016/j.virusres.2016.11.020
- Schlegel, R., Benjamin, T.L., 1978. Cellular alterations dependent upon the polyoma virus Hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* 14, 587–599.
- Schneider, M.A., Spoden, G.A., Florin, L., Lambert, C., 2011. Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell. Microbiol.* 13, 32–46. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01515.x
- Schowalter, R.M., Buck, C.B., 2013. The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. *PLoS Pathog.* 9, e1003558. doi:10.1371/journal.ppat.1003558

- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.*, Recent Advances in Porcine Circoviruses and Associated Diseases 164, 10–19. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.007
- Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S.-J., Chae, C., 2014. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-014-2164-6
- Serrano, B., Alemany, L., Tous, S., Bruni, L., Clifford, G.M., Weiss, T., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., 2012. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect. Agent. Cancer* 7, 38. doi:10.1186/1750-9378-7-38
- Shang, S.-B., Jin, Y.-L., Jiang, X., Zhou, J.-Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L., Yan, Y., 2009. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol. Immunol.* 46, 327–334. doi:10.1016/j.molimm.2008.10.028
- Shen, H.-G., Zhou, J.-Y., Huang, Z.-Y., Guo, J.-Q., Xing, G., He, J.-L., Yan, Y., Gong, L.-Y., 2008. Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vaccines in mice. *J. Gen. Virol.* 89, 1857–1865. doi:10.1099/vir.0.2008/000125-0
- Shi, J., Peng, Z., Fu, F., Xu, S., Xu, S., Cong, X., Yuan, X., Yu, J., Wu, J., Sun, W., Du, Y., Li, J., Wang, J., 2015. Mutant Rep protein of the porcine circovirus type 2 N-glycosylation:23–25aa, 256–258aa mutation reduced virus replication but 286–288aa mutation enhanced virus replication in PK-15 cells. *Vet. Microbiol.* 177, 370–372. doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.016
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., Yasui, K., 2004. Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *J. Virol.* 78, 9890–9903. doi:10.1128/JVI.78.18.9890-9903.2004
- Skrastina, D., Bulavaite, A., Sominskaya, I., Kovalevska, L., Ose, V., Priede, D., Pumpens, P., Sasnauskas, K., 2008. High immunogenicity of a hydrophilic component of the hepatitis B virus preS1 sequence exposed on the surface of three virus-like particle carriers. *Vaccine* 26, 1972–1981. doi:10.1016/j.vaccine.2008.02.030
- Soeda, E., Krauzewicz, N., Cox, C., Stokrová, J., Forstová, J., Griffin, B.E., 1998. Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther.* 5, 1410–1419. doi:10.1038/sj.gt.3300748
- Song, Y., Jin, M., Zhang, S., Xu, X., Xiao, S., Cao, S., Chen, H., 2007. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 119, 97–104. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.026
- Spink, K.M., Fluck, M.M., 2003. Polyomavirus hr-t mutant-specific induction of a G2/M cell-cycle arrest that is not overcome by the expression of middle T and/or small T. *Virology* 307, 191–203.
- Ssemadaali, M.A., Ilha, M., Ramamoorthy, S., 2015. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. *Res. Vet. Sci.* 103, 179–186. doi:10.1016/j.rvsc.2015.10.006
- Stadejek, T., Woźniak, A., Mišek, D., Biernacka, K., 2017. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12672
- Stamatos, N.M., Chakrabarti, S., Moss, B., Hare, J.D., 1987. Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J. Virol.* 61, 516–525.
- Stehle, T., Harrison, S.C., 1997. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16, 5139–5148. doi:10.1093/emboj/16.16.5139
- Stehle, T., Harrison, S.C., 1996. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Struct. Lond. Engl.* 1993 4, 183–194.
- Stokrová, J., Palková, Z., Fischer, L., Richterová, Z., Korb, J., Griffin, B.E., Forstová, J., 1999. Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* 445, 119–125.

- Stow, N.D., McMonagle, E.C., Davison, A.J., 1983. Fragments from both termini of the herpes simplex virus type 1 genome contain signals required for the encapsidation of viral DNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 8205–8220. doi:10.1093/nar/11.23.8205
- Streuli, C.H., Griffin, B.E., 1987. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326, 619–622. doi:10.1038/326619a0
- Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R., Lilie, H., 2001. Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem. J.* 356, 867–873.
- Suzich, J.A., Ghim, S.J., Palmer-Hill, F.J., White, W.I., Tamura, J.K., Bell, J.A., Newsome, J.A., Jenson, A.B., Schlegel, R., 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11553–11557.
- Sweet, B.H., Hilleman, M.R., 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 105, 420–427.
- Talmage, D.A., Freund, R., Dubensky, T., Salcedo, M., Gariglio, P., Rangel, L.M., Dawe, C.J., Benjamin, T.L., 1992. Heterogeneity in state and expression of viral DNA in polyoma virus-induced tumors of the mouse. *Virology* 187, 734–747.
- Tegerstedt, K., Lindencrona, J.A., Curcio, C., Andreasson, K., Tullus, C., Forni, G., Dalianis, T., Kiessling, R., Ramqvist, T., 2005. A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res.* 65, 5953–5957. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0335
- Timmusk, S., Fossum, C., Berg, M., 2006. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *J. Gen. Virol.* 87, 3215–3223. doi:10.1099/vir.0.81785-0
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64–66. doi:10.1038/295064a0
- Tobery, T.W., Smith, J.F., Kuklin, N., Skulsky, D., Ackerson, C., Huang, L., Chen, L., Cook, J.C., McClements, W.L., Jansen, K.U., 2003. Effect of vaccine delivery system on the induction of HPV16L1-specific humoral and cell-mediated immune responses in immunized rhesus macaques. *Vaccine* 21, 1539–1547.
- Tomita, Y., Literak, I., Ogawa, T., Jin, Z., Shirasawa, H., 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35, 243–249. doi:10.1007/s11262-006-0055-y
- Touzé, A., Bousarghin, L., Ster, C., Combita, A.L., Roingeard, P., Coursaget, P., 2001. Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 82, 3005–3009. doi:10.1099/0022-1317-82-12-3005
- Trible, B.R., Rowland, R.R.R., 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res., Recent Advances in Porcine Circoviruses and Associated Diseases* 164, 68–77. doi:10.1016/j.virusres.2011.11.018
- Trus, B.L., Roden, R.B., Greenstone, H.L., Vrhel, M., Schiller, J.T., Booy, F.P., 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 413–420.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22, 4346–4355. doi:10.1093/emboj/cdg439
- Umemura, T., Yeo, A.E.T., Sottini, A., Moratto, D., Tanaka, Y., Wang, R.Y.-H., Shih, J.W.-K., Donahue, P., Primi, D., Alter, H.J., 2001. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 33, 1303–1311. doi:10.1053/jhep.2001.24268
- Vega-Rocha, S., Byeon, I.-J.L., Gronenborn, B., Gronenborn, A.M., Campos-Olivas, R., 2007. Solution Structure, Divalent Metal and DNA Binding of the Endonuclease Domain from the Replication Initiation Protein from Porcine Circovirus 2. *J. Mol. Biol.* 367, 473–487. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.002

- Viruses, P.S.G. of the I.C. on T. of, Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750. doi:10.1007/s00705-016-2794-y
- Vlastos, A., Andreasson, K., Tegerstedt, K., Holländerová, D., Heidari, S., Forstová, J., Ramqvist, T., Dalianis, T., 2003. VP1 pseudocapsids, but not a glutathione-S-transferase VP1 fusion protein, prevent polyomavirus infection in a T-cell immune deficient experimental mouse model. *J. Med. Virol.* 70, 293–300. doi:10.1002/jmv.10394
- Voronkova, T., Kazaks, A., Ose, V., Ozel, M., Scherneck, S., Pumpens, P., Ulrich, R., 2007. Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes* 34, 303–314. doi:10.1007/s11262-006-0028-1
- Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145, 151–156. doi:10.1016/j.virusres.2009.05.015
- Wang, T., Yu, B., Lin, L., Zhai, X., Han, Y., Qin, Y., Guo, Z., Wu, S., Zhong, X., Wang, Y., Tong, L., Zhang, F., Si, X., Zhao, W., Zhong, Z., 2012. A functional nuclear localization sequence in the VP1 capsid protein of coxsackievirus B3. *Virology* 433, 513–521. doi:10.1016/j.virol.2012.08.040
- Wang, X., Jiang, P., Li, Y., Jiang, W., Dong, X., 2007. Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 121, 215–224. doi:10.1016/j.vetmic.2006.11.027
- Wang, X., Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Feng, Z., Xu, J., 2006. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine* 24, 3374–3380. doi:10.1016/j.vaccine.2005.12.068
- Wang, X., Li, Y., Jiang, P., 2009. [Construction and immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing Cap protein of PCV2 and GP5 protein of PRRSV in mice]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao Chin. J. Biotechnol.* 25, 1639–1645.
- Warfield, K.L., Bosio, C.M., Welcher, B.C., Deal, E.M., Mohamadadeh, M., Schmaljohn, A., Aman, M.J., Bavari, S., 2003. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15889–15894. doi:10.1073/pnas.2237038100
- Wolf, M., Garcea, R.L., Grigorieff, N., Harrison, S.C., 2010. Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6298–6303. doi:10.1073/pnas.0914604107
- Wu, P.-C., Chien, M.-S., Tseng, Y.-Y., Lin, J., Lin, W.-L., Yang, C.-Y., Huang, C., 2008. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. *J. Biotechnol.* 133, 58–64. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.09.015
- Wu, P.-C., Lin, W.-L., Wu, C.-M., Chi, J.-N., Chien, M.-S., Huang, C., 2012. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1501–1507. doi:10.1007/s00253-012-4015-2
- Wu, T., Hu, Y.-M., Li, J., Chu, K., Huang, S.-J., Zhao, H., Wang, Z.-Z., Yang, C.-L., Jiang, H.-M., Wang, Y.-J., Lin, Z.-J., Pan, H.-R., Sheng, W., Wei, F.-X., Li, S.-W., Wang, Y., Zhu, F.-C., Li, C.-G., Zhang, J., Xia, N.-S., 2015. Immunogenicity and safety of an E. coli-produced bivalent human papillomavirus (type 16 and 18) vaccine: A randomized controlled phase 2 clinical trial. *Vaccine* 33, 3940–3946. doi:10.1016/j.vaccine.2015.06.052
- Wu, T., Zhu, F.-C., Huang, S.-J., Zhang, X.-F., Wang, Z.-Z., Zhang, J., Xia, N.-S., 2012. Safety of the hepatitis E vaccine for pregnant women: a preliminary analysis. *Hepatol. Baltim. Md* 55, 2038. doi:10.1002/hep.25522
- Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J. Gen. Virol.* 96, 1830–1841. doi:10.1099/vir.0.000100
- Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J. Virol.* 86, 12469. doi:10.1128/JVI.02345-12

- Yin, S., Sun, S., Yang, S., Shang, Y., Cai, X., Liu, X., 2010. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virol. J.* 7, 166.
doi:10.1186/1743-422X-7-166
- Zahin, M., Joh, J., Khanal, S., Husk, A., Mason, H., Warzecha, H., Ghim, S.-J., Miller, D.M., Matoba, N., Jenson, A.B., 2016. Scalable Production of HPV16 L1 Protein and VLPs from Tobacco Leaves. *PloS One* 11, e0160995. doi:10.1371/journal.pone.0160995
- Zhang, R., Li, M., Chen, C., Yao, Q., 2004. SHIV virus-like particles bind and activate human dendritic cells. *Vaccine* 23, 139–147. doi:10.1016/j.vaccine.2004.05.036
- Zhang, S., Cubas, R., Li, M., Chen, C., Yao, Q., 2009. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells. *Mol. Immunol.* 46, 1988–2001. doi:10.1016/j.molimm.2009.03.008
- Zhang, X., Wei, M., Pan, H., Lin, Z., Wang, K., Weng, Z., Zhu, Y., Xin, L., Zhang, J., Li, S., Xia, N., Zhao, Q., 2014. Robust manufacturing and comprehensive characterization of recombinant hepatitis E virus-like particles in Hecolin®. *Vaccine* 32, 4039–4050.
doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.064
- Zhou, J.-Y., Shang, S.-B., Gong, H., Chen, Q.-X., Wu, J.-X., Shen, H.-G., Chen, T.-F., Guo, J.-Q., 2005. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J. Biotechnol.* 118, 201–211.
doi:10.1016/j.jbiotec.2005.02.017

10. Přílohy

10.1 Seznam příloh:

10.1.1 Publikace:

1. **„Exploitation of stable nanostructures based on the Mouse polyomavirus for development of a recombinant vaccine against Porcine circovirus 2“.**
Martin Fraiberk, Michaela Hájková, Magdalena Krulová, Martina Kojzarová, Alena Drda Morávková, Ivan Pšikal, Jitka Forstová
Publikace v revizi, PloS One
2. **„VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle“.**
Horníková L, Fraiberk M, Man P, Janovec V, Forstová J.
FEBS J. 2017 Jan;284(2):301-323. doi: 10.1111/febs.13977.
3. **„Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials“.**
Henke P, Kirakci K, Kubát P, Fraiberk M, Forstová J, Mosinger J.
ACS Appl Mater Interfaces. 2016 Sep 28;8(38):25127-36. doi: 10.1021/acsami.6b08234.
4. **„Seroprevalence Rates of BKV, JCV, and MCPyV Polyomaviruses in the General Czech Republic Population“.**
Šroller Vojtěch, Eva Hamšíková, Viera Ludvíková, Petra Vochozková, Martina Kojzarová, Martin Fraiberk, Martina Saláková, Alena Morávková, Jitka Forstová, and Šárka Němečková. 2014. Journal of Medical Virology 86 (9): 1560–68.
doi:10.1002/jmv.23841.
5. **„The Encapsidation of Polyomavirus Is Not Defined by a Sequence-Specific Encapsidation Signal.“**
Španielová, Hana, Martin Fraiberk, Jiřina Suchanová, Jakub Soukup, and Jitka Forstová. 2014 Virology 450-451: 122–31. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.010.
6. **„Nuclear Actin and Lamins in Viral Infections“.**
Cibulka, Jakub, Martin Fraiberk, and Jitka Forstová. 2012. Viruses 4 (3): 325–47.
doi: 10.3390/v4030325

10.1.2 Patenty, užité vzory, funkční vzorky

- Patentová přihláška, Vakcína založená na proteinové chimérické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2.
- Užité vzor č. 29249 BPV1, Vakcína založená na proteinové virové nanočástici odvozené od bovinního papilomaviru 1.
- Užité vzor č. 29310 PCV2, Vakcína založená na proteinové chimérické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2.
- Funkční vzorek, Diagnostický antigen založený na rekombinantním proteinu VP1-Cap.

10.1.3 Příloha k publikaci

- Data k průtokové cytometrii v publikaci: VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle.